Das proteolytische Enzym der Hefe.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doctorwürde

bei der

Hohen philosophischen Facultät

der

kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Geret

Assistent am hygienischen Institut der Universität München

aus Rothenburg o. Tbr.

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1900.

Das proteolytische Enzym der Hefe.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doctorwürde

bei der

Hohen philosophischen Facultät

der

kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Geret

Assistent am hygienischen Institut der Universität München

aus Rothenburg o. Tbr.

München.

Druck von R. Oldenbourg

1900.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548324_0188

Die Nutzbarmachung von Eiweisskörpern als organische Nahrung, speciell als Stickstoffquelle, hat für chlorophyllfreie Pflanzen und die noch auf Reservestoffe angewiesenen Keimlinge der chlorophyllhaltigen Pflanzen besondere Bedeutung; sie ist auch bei vielen grünen niederen und höheren Individuen des Pflanzenreiches bekannt. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, in wie mannigfacher Weise die verschiedenen pflanzlichen Organismen diesen Theil der Assimilation vollziehen. Viele heterotrophe und auch wenige autotrophe Pflanzen verdauen Eiweissnahrung, indem sie bestimmte und unter sich wieder verschiedene Enzyme secerniren und dadurch unlösliche Eiweisskörper extracellulär löslich machen oder lösliche colloidale in diffusible, zur Aufnahme durch die Pflanzen geeignete Stoffe umwandeln. Bei anderen hingegen sind nur bestimmte, oft in einer begrenzten Wachsthumsperiode auftretende Körper isolirt, deren Vorhandensein den Schluss auf die (intracelluläre) Wirkung eines verdauenden Enzymes zulässt, in vielen genauer untersuchten Fällen auch unbedingt erfordert. Forscher wie Green, E. Schulze, Fermi, Neumeister u. A. haben in letzter Zeit dieses Gebiet eifrig bearbeitet und immer mehr eine weite Verbreitung eiweisslösender Enzyme in der Pflanzenzelle constatirt.

Eine willkommene Gelegenheit, diese Vorgänge an der Hefe in übersichtlicher und einwandfreier Weise zu studiren, bot sich, als das von H. u. E. Buchner und deren Mitarbeitern ausgebildete Verfahren die Gewinnung eines klaren, an Inhaltstoffen der Hefezellen sehr reichen Presssaftes möglich machte, in welchem M. Hahn alsbald die Anwesenheit eines proteolytischen Enzymes constatiren konnte. Der ausserordentlich hohe Gehalt der Hefe an Proteïnstoffen im Vergleich zu dem der meisten höheren Pflanzen (er beträgt mehr als die Hälfte des Hefetrockengewichtes) machte sie zu einem besonders geeigneten Objecte.

Historisches.

In der früheren Litteratur sind zahlreiche Beobachtungen, meist nur gelegentliche, verzeichnet, dass ältere Hefezellen von selbst fast den ganzen Inhalt verlieren. Sie weisen die Hefe in diejenige oben gekennzeichnete Categorie, bei der nur das Vorhandensein typischer Verdauungsproducte constatirt und aus diesem Nachweis auf die intracelluläre Wirkung eines proteolytischen Enzymes geschlossen wurde.

Thenard[1]) schon bemerkte, dass Hefe während des Gährungsactes nach und nach stickstoffärmer wird, indem sie sich in lösliche Producte umwandelt.

Pasteur[2]) gibt genauer an, dass Hefe beim Vergähren von reiner Zuckerlösung an Gewicht abnimmt, wenn das Gewicht der zugesetzten Hefe mehr als 15% des Zuckers beträgt, also Nahrungsmangel eintritt. In solcher Hefe sank der Stickstoffgehalt von 9,7% auf 5,5%.

Ducleaux[3]) machte die gleiche Beobachtung, nur mit wesentlich höheren Zahlen für das Verhältniss von Hefe zum Zucker; er benützte aber eine Hefe mit geringerem Gehalt an Trockensubstanz.

---

1) Annales de chimie T. 46 p. 294.
2) Ann. de chimie et phys. T. 58 p. 401.
3) Theses prés. à la fac. de Sciences de Paris 1865, p. 44.

Mayer[1]) führt diese Beobachtungen an mit dem Bemerken, dass nach Addition der Extractmenge aus der vergohrenen Flüssigkeit (abzüglich Glycerin und Bernsteinsäure) zum Gewicht der nach der Gährung erhaltenen trockenen Hefe doch immer ein Plus zu constatiren ist gegen die Menge trockener Hefe vor der Gährung und zwar annähernd proportional der vergohrenen Zuckermenge, dem einzigen gebotenen und wohl namentlich zur Bildung von Cellulose verwendeten Nahrungsmittel, während die Extractmenge fast proportional war der angewendeten Hefemenge, d. h. der Menge der Zellen, welche wegen Mangel an Stickstoff und anderen Hefebestandtheilen hungern und deren Nahrungsbedürfniss mit steigendem Hefezusatz vermehrt werden musste.

Béchamp und nach ihm Schützenberger haben eine Reihe von Stoffen im Auswaschwasser erweichter Hefe gefunden, die als typische Producte der Hydratation von Eiweisskörpern gelten.

Béchamp[2]) gaben diese Befunde sogar Anlass zu seiner physiologischen Gährungstheorie: »An der Hefe, gleichwie an jedem lebenden Organismus, beobachten wir eine doppelte Reihe von Erscheinungen. Zuerst die Erscheinungen der Ernährung und Assimilation, bedingt durch die Anwesenheit ihrer Nährstoffe (Zucker, stickstoffhaltige Substanzen, mineralische Salze); diese verschiedenen Substanzen nämlich treten endosmotisch in die Zellen über, werden hier umgewandelt und zur Neubildung von Geweben für die neu entsprossenden Zellen verwendet. Parallel diesen Nutritionsvorgängen verlaufen aber umgekehrt die Desassimilationsvorgänge, wodurch die Gewebe in excrementielle Stoffe umgewandelt werden, die dem Leben der Zelle nicht mehr zuträglich sind und ausgestossen werden. Alkohol und Kohlensäure rechnete er ebenfalls dazu.

Nach Schützenberger[3]) lassen sich aus Hefe, die einen feuchten Brei bildet und bei 25—30° mit kreosothaltigem Wasser

1) A. Mayer, Gährungschemie 1895, S. 118.
2) P. Schützenberger, Gährungschemie 1876, S. 116.
3) P. Schützenberger, a. a. O. S. 108.

aufbewahrt wurde, mit warmem Wasser weit mehr lösliche und diffusible Substanzen extrahiren als aus frischer, ebenso behandelter Hefe. Er bezeichnete solche Hefe als der Inanition (Entkräftung, Erschöpfung aus Mangel an Nahrung) überlassene. Je 100 g Hefe, bei 100° getrocknet, gaben Rückstand:

frische, direct . . . . . 30 g
frische, ausgewaschen . . . . . 23 »
nach zweitägiger freiwilliger Erweichung, gewaschen 14 »

Ein zweiter Versuch ergab aus je 100 g Hefe:

frisch, direct	bei 30%	Trockensubstanz	2,78 g Stickstoff
frisch, ausgewaschen	» 20%	»	2,03 » »
nach 15stündigem Stehen bei 37° ausgewaschen	» 12,5%	»	0,94 » »

Also während der Digestion ein Verlust von 7,5% Trockensubstanz und 1,09% Stickstoff, das sind 53,7% des vorher vorhandenen Stickstoffes. Aus der Differenz des Stickstoffgehaltes vor und nach der Erweichung berechnete er, dass »die festen Körper, welche im Extracte der mit kaltem Wasser ausgewaschenen und der Erweichung überlassenen Hefe vorkommen, zum grössten Theile, wenn nicht vollständig, Derivate der Proteïnsubstanzen sein müssen«. Im wässerigen Auszug frischer Hefe fand er die nämlichen Bestandtheile und kam dadurch zu dem Schlusse, dass »diese Erscheinungen der Effect einer continuirlich wirkenden Ursache seien, welcher durch die Versuchsbedingungen nur gesteigert werde«.

Nägeli[1]) fand bei seinen Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Hefe, als er dieselbe mit genügend Wasser unter Zusatz von 1% Phosphorsäure während eines Jahres aufbewahrte, Abnahme der Trockensubstanz um 37,4%. Bei dieser »Involution der Zellen« würde nach ihm die ganze oder fast die ganze Menge der Albuminate (?) als Peptone ausgeschieden. Die gefundenen Mengen von Leucin, Xanthin etc. erklärte er[2]) als

1) Naegeli u. O. Loew, Journ. f. prakt. Chemie 1878, S. 404.
2) a. a. O. S. 411.

durch die Einwirkung des Sauerstoffes entstanden, als Producte der Respiration.

E. Salkowski[1]) digerirte Hefe mit Chloroformwasser zwei bis drei Tage bei 37° und fand u. a. nach dieser Zeit den Leucin- und Tyrosingehalt beträchtlich vermehrt. Er führte die Bildung dieser Stoffe auf einen fermentativen Process zurück, da sie nicht stattfindet in genau ebenso angestellten Controlversuchen, bei denen die Hefe vorher sterilisirt war.

Boullanger[2]), Beyerinck[3]), Artari[4]), Wehmer[5]) und besonders Will[6]) haben in neuester Zeit die proteolytischen Erscheinungen bei der Hefe eingehender studirt und auch die physiologischen und biologischen Bedingungen der Enzymbildung in Erwägung gezogen. Auf diese Arbeiten soll später näher eingegangen werden.

Endlich hat M. Hahn[7]) auch im Presssafte der Bierhefe durch Ueberschichten desselben auf Carbolgelatine das Vorhandensein des proteolytischen Enzymes nachgewiesen und diese Beobachtung gab Veranlassung zu den folgenden Versuchen.

Gewinnung und Eigenschaften des Hefepresssaftes.

Zunächst sei die Herstellung des Hefepresssaftes kurz beschrieben: 1 kg Münchener untergähriger Bierhefe, gewaschen und abgepresst, jedoch noch ohne Stärkezusatz aus der Presshefefabrik bezogen, wurde mit 1 kg Quarzsand und 200 g Kieselguhr mittels einer beschwerten Reibvorrichtung oder mittels Maschine so lange verrieben, bis das Gemenge eine plastische weiche Masse darstellte, aus welcher sich sodann unter der hydraulischen Presse, bei langsamer Steigerung des Druckes bis auf ca. 300 Atmosphären ein klarer, opalescirender, gelber, hefeartig riechender, eigenthümlich aromatisch schmeckender Saft

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 13 S. 506.
2) Ann. Pasteur 1897, S. 722.
3) Centralbl. f. Bact. u. Parasitenkunde 1897, II. Abth. S. 521.
4) Wochenschr. f. Brauerei 1897, S. 602.
5) Ref. v. Will. Centralbl. f. Bact. 1896, II. Abth. S. 92.
6) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1898, No. 11—15.
7) E. Buchner, Ber. d. d. chem. Ges. 1897, S. 1111.

gewinnen liess; die Menge desselben betrug 450—500 ccm. Bei geringerer Ausbeute wurde der Presskuchen nochmals mit 50 ccm destillirtem Wasser angerieben und dann mit dem zweiten noch eiweissreichen Presssafte sicher 500 ccm Gesammtausbeute erhalten.

Die erhaltene Flüssigkeit reagirte, auch frisch, immer sauer, entgegen einer Bemerkung A. Wroblewski's[1]), der in frischem Safte eine schwach alkalische Reaction constatirte. Der klare Presssaft enthält nur noch wenige Hefezellen, welche sich nach wiederholter Filtration durch mit Kieselguhr gedichtete Papierfilter fast ganz beseitigen lassen. Er ist überaus eiweissreich, so dass er beim Erwärmen auf 40° schon eine Gerinnung zeigt und bei Siedetemperatur zu einer förmlichen Gallerte erstarrt, welche oft ein Umstürzen des Reagensglases ermöglicht, ohne dass etwas von der Flüssigkeit ausfliessen kann.

Von den Eiweissstoffen der Hefezellen ist durch dieses Verfahren der vierte Theil in Lösung gebracht, wie die folgende Tabelle I beweist, und die Trockensubstanz des Presssaftes besteht bei Berechnung des Stickstoffes auf Eiweiss fast ganz aus dieser Substanz und deren Derivaten[2]), so dass man annehmen kann, dass von der Trockensubstanz der Hefe ausser der des Zellsaftes fast nur Eiweiss und Eiweissderivate in Lösung gebracht wurden.

Tabelle I.

	Pro 100 g feuchte Hefe	Pro 100 ccm Presssaft	Im Auszug enthalten in % der Hefebestandtheile
A. Trockenrückstand . .	25,9	9,82	17
Stickstoff	2,225	0,982	22
B. Trockenrückstand . .	25,6	10,91	21,3
Stickstoff	2,28	1,167	25,6
Phosphor	0,38	0,228	29,9
Schwefel	0,14	0,065	23,2

1) Anzeiger d. Acad. d. Wiss. zu Krakau. Nov. 1898.
2) Siehe auch Tabellen II und III.

Betreffs des Stickstoffs konnte das gleiche Verhältniss auch bei der Bereitung von Tuberkuloplasmin nach dieser Pressmethode erreicht werden. Es waren im Presssaft enthalten 16, 23 und 26% des Stickstoffes der verwendeten Tuberkelbacillen.

Im frischen Hefepresssaft verhält sich nach der Coagulation die Menge des Filtratstickstoffes zu der des Stickstoffes im coagulirten Eiweiss ziemlich übereinstimmend wie 6:10.

Die Invertin — und namentlich die Gährwirkung des von lebenden Hefezellen befreiten Hefeplasmins, welche E. Buchner und R. Rapp unterdessen[1]) sicher festgestellt haben, soll hier nur erwähnt werden; ebenso das Vorhandensein einer Oxydase und einer reducirenden Substanz.

Schichtet man einige Cubikcentimeter des Presssaftes unter Zusatz weniger Tropfen Chloroform auf Carbol- oder Thymolgelatine in einem Reagensrohr, so beginnt nach sechs bis zehn Stunden bei Zimmertemperatur deren Verflüssigung, die dann so rasch fortschreitet, dass nach zwei bis drei Tagen die ganze hohe Gelatineschicht (ca. 20 ccm) verflüssigt ist. Absolute Sterilität der Flüssigkeit und Gelatine garantirt der Zusatz der Antiseptica, sie wurde ausserdem wiederholt constatirt. Unter den gleichen Cautelen und unter Beschleunigung der Enzymwirkung durch höhere Temperatur, indem die Proben im Brutschrank aufgestellt wurden, konnte auch Carminfibrin in 24 Stunden gelöst werden und ebenso war Eieralbumin, wenn auch etwas weniger leicht, der Proteolyse durch Hefepresssaft zugänglich.

Selbstverdauung.

Wird Hefepresssaft unter genügendem Chloroform- oder Toluolzusatz entweder im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so ist bei ersterem nach ca. drei Wochen, bei letzterem schon nach 10—14 Tagen beim Kochen keine Coagulation mehr hervorzurufen, während der Saft gelb und fast klar bleibt und fast unverändert scheint. Anders während der Digestion im Thermostaten bei 37°; hier tritt in der Regel schon nach zwei Stunden ein starkes Gerinnsel auf, fast analog dem durch Lab-

1) Ber. d. d. chem. Ges. 1897—98.

wirkung in der Milch zu erhaltenden, das sich bald zu Boden setzt. Es löst sich zum grösseren Theil in 10proc. Chlornatrium- und 10proc. Sodalösung. Man darf diesen Theil des Eiweisses wohl zu den Globulinen resp. Nucleïnen rechnen. Der anfangs rein weisse Niederschlag vermindert sich im Laufe der folgenden vier bis fünf Tage bis auf einen geringen grauen Rest, während die darüberstehende klare Flüssigkeit dunkler wird und nach acht Tagen rothbraun erscheint.

Im Sediment lassen sich bei mikroskopischer Beobachtung nach sechs bis acht Tagen Krystallbüschel von der charakteristischen Form des Tyrosins unterscheiden, später durch Filtration in grösserer Menge isoliren und durch die Hofmann'sche und Piria'sche Reaction identificiren. In sehr vielen Fällen waren auch mit blossem Auge reichliche, bis linsengrosse weisse Kugeln im Sediment zu bemerken oder an den Wänden des Glases halbkugelig auskrystallisirt; sie gaben ebenfalls Tyrosinreaction und schlossen auch Xanthinkörper ein.

Dampft man solchen, bei niederer oder höherer Temperatur verdauten Presssaft ein, so resultirt ein dichter Krystallbrei, aus dem leicht grosse Mengen von Leucin isolirt werden können. Es tritt in der charakteristischen Kugelform auf, lässt sich in Leucinkupfer überführen und in den bekannten, flockig wolligen Massen sublimiren; einfache, billige Darstellung.

Zunächst seien einige Versuchsreihen angeführt, welche das Verschwinden des coagulirbaren Eiweisses und die Zunahme des Stickstoffes im Filtrate für den bei 37° digerirten Presssaft darthun. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, dass von einer grösseren Menge des Hefepresssaftes, der dauernd bei 37° gehalten wurde, in verschiedenen Zwischenräumen nach gutem Durchschütteln Proben entnommen wurden. Hier, wie bei allen folgenden Versuchen, wurden selbstverständlich als Antiseptica Chloroform oder Toluol zugesetzt und bei diesen und vielen anderen Versuchsreihen die Sterilität der Flüssigkeit wiederholt durch aërobe und anaërobe Cultur controlirt.

In einer Probe wurde der Trockenrückstand nach Trocknung bei 100° und der Aschengehalt bestimmt.

Eine andere Portion von je 10 ccm wurde mit 50 ccm Wasser verdünnt und dann durch Aufkochen unter Zusatz von 5 ccm gesättigter Kochsalzlösung und einigen Tropfen 1 proc. Essigsäure das Eiweiss coagulirt, abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. In zwei Reihen wurde auch noch in dem gewonnenen Coagulat der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nach sechs bis acht Tagen enthält freilich die Flüssigkeit kaum noch coagulirbares Eiweiss, der Niederschlag besteht vielmehr grösstentheils aus Leucin, Tyrosin und nur, um vergleichbare Resultate zu gewinnen, wurde das gleiche Verfahren weiter angewendet.

In einer dritten Probe wurde, nachdem sie gleichfalls durch Kochen vom coagulirbaren Eiweiss befreit war, der Stickstoffgehalt eines abgemessenen Theiles des Filtrates bestimmt.

Eine vierte Portion diente zur Bestimmung des Gesammtstickstoffs im frischen Presssaft.

Tabelle II.

In Procenten der Flüssigkeit			
Datum	Coagulat, gewogen	Stickstoff des Filtrats	Bemerkungen
13. VII.	4,15	0,398	frisch
17. »	0,165	1,03	nach 4 Tagen
19. »	0,05	0,98	» 6 »

Tabelle III.

In Procenten der Flüssigkeit						
Datum	Gesammtrückstand	Gesammtstickstoff	Coagulat, gewogen	Coagulatstickstoff	Filtratstickstoff	Bemerkungen
20. X.	9,3	1,03	4,38	0,64	0,42	frisch
21. »	—	—	1,43	0,19	0,85	nach 1 Tag
26. »	—	—	0,14	0,02	1,03	» 6 Tagen

Tabelle IV.

Datum	In Procenten der Flüssigkeit: Gesammtrückstand	Gesammtasche	Gesammtstickstoff	Coagulat, gewogen	Coagulatstickstoff	Filtratstickstoff	Bemerkungen
4. XI	12,12	1,82	1,44	5,99	0,93	0,52	frisch
5. »	—	—	—	1,87	0,25	1,19	nach 1. Tag
6. »	—	—	—	0,5	0,05	1,4	nach 2 Tagen
8. »	—	—	—	0,28	0,025	1,42	nach 4 Tagen, Sediment ungeformt, mikrosk. kein Leucin oder Tyrosin nachweisbar
10. »	—	—	—	0,21	0,02	1,44	9.—10. XI. Saft trübe, steril; 10. XI. Tyrosinbüschel im Sediment
4. XII	—	—	1,44	—	0,16	1,26	nach 30 Tagen.

Bei allen drei Versuchen betrug nach zwei Tagen das Coagulat nur noch den zehnten Theil, der Filtrat-Stickstoff mehr als das Doppelte.

Die gleichen Resultate bezüglich der Abnahme des Coagulates ergaben Presssäfte, welche aus zwei verschiedenen Getreidehefen gewonnen waren und nur schwache Gährwirkung zeigten.

Tabelle V.

	Coagulat in Procenten der Flüssigkeit: vor der Digestion	nach 20stündiger Digestion bei 37°
1. Presssaft aus Hefe . . . Lechner	2,72	0,87
2. Presssaft aus Hefe . . . Wieninger	3,4	0,69

Um von der Vertheilung des Stickstoffs auf die verschiedenen Producte der Verdauung eine Vorstellung zu gewinnen, wurde die Fällung mit Phosphorwolframsäure angewandt: Durch die Phosphorwolframsäure werden bekanntlich die stickstoffhaltigen Basen gefällt, die Amidosäuren dagegen nicht; Albumosen und Peptone kommen nicht in Betracht, wie weiter unten gezeigt wird. 50 ccm Presssaft wurden mit Wasser verdünnt, coagulirt und die Mischung zu 250 ccm aufgefüllt. Vom Filtrate wurden

50 ccm zur directen Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet, 50 ccm dagegen mit einem Ueberschuss von Phosphorwolframsäure, die mit Schwefelsäure versetzt war, gefällt. Nach 24 Stunden wurde abfiltrirt, der Niederschlag mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen und sodann zur Stickstoffbestimmung, gleichfalls nach Kjeldahl, verbrannt. Der Niederschlag enthielt die stickstoffhaltigen Basen, die Differenz zwischen dem Stickstoffgehalt des Gesammtfiltrates und demjenigen des Niederschlages ist auf die Amidosäuren zu beziehen.

Tabelle VI.

Gesammtstickstoff = 1,308 % des Presssaftes.

Datum	Filtrat-N		PWo-Fällung = Basen-N		Differenz = Säuren-N	
	Procent des Saftes	Proc. des Gesammt-N	Procent des Saftes	Proc. des Filtrat-N	Procent des Saftes	Proc. des Filtrat-N
7. III.	0,434	33,3	0,141	32,4	0,293	67,6
8. »	1,117	85,8	0,447	40,0	0,670	60,0
9. »	1,292	99,2	0,473	36,3	0,819	63,7
10. »	1,304	100	0,451	34,6	0,853	65,4
21. »	1,302	100	0,433	33,2	0,869	66,8
22. IV.	1,300	100	0,341	26,2	0,859	73,8

Bemerkenswerth ist in dieser Tabelle, dass anfänglich die Menge der stickstoffhaltigen Basen ansteigt, später aber wieder sinkt und schliesslich nach zwei Wochen das Verhältniss des Amidosäurenstickstoffs zum Basenstickstoff das gleiche ist, wie zu Beginn des Versuches. Für diese Erscheinung kann das weiter unten zu besprechende Verhalten der Xanthinkörper nicht zur Erklärung herangezogen werden, denn ihre Menge ist zu gering, um den Gesammtwerth des in den Basen enthaltenen Stickstoffs wesentlich zu beeinflussen und der Xanthinwerth bleibt, wie die folgenden Versuche zeigen, auch nach längerer Zeit constant. Zum Theil wird die vorübergehende Vermehrung des Basenstickstoffs bedingt durch mitgefällte Albumosen, die aber nur ganz zu Anfang der Verdauung und in geringen Mengen auftreten. Pepton wird auch intermediär nicht gebildet, wie unten besprochen werden soll.

Das Verhalten der Xanthinkörper (meist Hypoxanthin und in den einzelnen Bestimmungen auch auf diese Verbindung berechnet) ist in frischem und verdautem Presssaft sehr bemerkenswerth. Schon Salkowski[1]) hatte die Beobachtung gemacht, dass sich die Xanthinkörper in den Filtraten solcher Hefe, die vor der Digestion sterilisirt war und nachher mit Chloroformwasser längere Zeit digerirt wurde, nicht direct mit ammoniakalischer Silberlösung fällen liessen, während diejenigen Hefeproben, die zuerst mit Chloroformwasser längere Zeit digerirt und dann erst gekocht wurden, die Xanthinkörper manifest, d. h. direct durch Silberlösung fällbar enthielten. In den sofort sterilisirten Proben konnten aber die Xanthinkörper der Silberfällung zugänglich gemacht werden, wenn die Lösung mit 1 proc. Schwefelsäure eine Stunde lang gekocht wurde. Sie waren also, wie Salkowski sagt, in latenter Form vorhanden. Er schliesst aus diesen Versuchen, dass hier die Wirkung eines Fermentes vorliegt, welche erstens auf Spaltung des Nucleïns, zweitens auf die Beseitigung störender Substanzen gerichtet ist.

Ein ähnliches Verhalten zeigten die Xanthinkörper auch im verdauten Presssafte. Zum Nachweis und zur Bestimmung[2]) wurden 40 ccm Presssaft coagulirt und auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden 50 ccm mit Ammoniak versetzt, der Niederschlag nach 24 Stunden abfiltrirt und das Filtrat mit 3 proc. ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt, mit verdünntem Ammoniak gewaschen, getrocknet, verascht und in Salpetersäure gelöst. Der Silbergehalt dieser Lösung liess sich durch Titration mit Rhodanammonlösung ermitteln und wurde auf Hypoxanthin berechnet.

Verfährt man mit dem frischen Presssafte in dieser Weise, so erhält man gar keinen Silberniederschlag, und selbst nach dem Kochen des Filtrates mit Schwefelsäure treten nur Spuren eines solchen auf. Aber auch der längere Zeit mit Chloroform digerirte, also verdaute Presssaft, gibt für gewöhnlich, direct mit

1) Zeitschr. f. phys. Chemie Bd. 13 S. 506 u. ff.
2) Nach Salkowski's Verfahren.

ammoniakalischer Silberlösung versetzt, keinen wägbaren Niederschlag, sondern erst nach dem Kochen mit Schwefelsäure. Der Niederschlag variirt dann in seiner Quantität und entspricht 30—60 mg Hypoxanthin in 100 ccm. So wurden in einem elf Tage lang digerirten Presssafte 56 mg pro 100 ccm Saft ermittelt, in einem drei Wochen alten 63 mg, in einem sechs Wochen alten 40 mg. Sehr auffallend war es daher, als in einer Probe von Presssaft schon nach eintägiger Digestion 41 mg Hypoxanthin pro 100 ccm direct, ohne Kochen mit Schwefelsäure fällbar waren und die Menge noch bedeutend stieg.

Tabelle VII.

Zeit der Digestion	Hypoxanthin pro 100 ccm in mg
1 Tag	0,0414
3 Tage	0,0728
7 Tage	0,0675
5 Wochen	0,1092

Es hatte dieser Presssaft eine starke Selbstgährung gezeigt. Doch enthielt ein anderer Saft, der mit einer vergährbaren Menge von Rohrzucker versetzt wurde, nach der Gährung bei Zimmertemperatur und darauffolgendem Stehen im Brutschrank ebenso wenig Xanthin in manifester Form wie die Controlprobe ohne Zucker.

Trotzdem war damals noch nicht die Annahme von der Hand zu weisen, dass bei dem einen Fall weniger der chemische Einfluss der Gährung oder der entstandenen Kohlensäure, als vielmehr die mechanische Wirkung der aufsteigenden Gasblasen in Betracht kommen könne. Es wurde deshalb Luft und Wasserstoff in der Weise 24 Stunden durch zwei Proben geleitet, dass diese in zwei Chudiakow'schen Gährgefässen in einem Wasserbade von 37° aufgestellt waren. Diese Gährgefässe, umgekehrte Erlenmeyerkolben, deren Hals in die Gaszuleitungsröhre ausgezogen ist, während am Boden eine angeschmolzene Halsöffnung für den Gasabzug dient, ermöglichen eine vollständige Durchlüftung der Flüssigkeit.

Als dann die Xanthinreaction negativ ausfiel, wurden die zwei Proben noch 14 Tage lang bei 37° digerirt, während eine dritte Portion zunächst 14 Tage lang bei 37° digerirt und dann erst mit Luft bezw. Wasserstoff behandelt wurde; jede der Proben, auch die Controle, wurde ausserdem zur Hälfte vor der Fällung mit 1 proc. Schwefelsäure gekocht.

Der Versuch ergab pro 100 ccm Presssaft folgende Mengen in Milligramm Hypoxanthin, wobei die Resultate unter A durch directe Fällung, die unter B nach vorausgegangenem Kochen mit Schwefelsäure erhalten waren:

Tabelle VIII.

	Frisch		nach 24 Stunden		nach 14 Tagen	
	A	B	A	B	A	B
1. mit Luftdurchleitung . .	0	0	Spur	Spur	99	100
2. » H-Durchleitung . . .	0	0	Spur	Spur	93	89
3. Controle	0	0	0	0	30	96
4. Controle m. nachträglicher Luftdurchleitung	0	0	0	0	30	96
5. Controle m. nachträglicher Wasserstoffdurchleitung .	0	0	0	0	26	96

Es ergibt sich also, dass die der Digestion vorangehende Luft- und Wasserstoffdurchleitung in ihrer Wirkung nicht vollkommen jenem aussergewöhnlichen Verhalten des Presssaftes entsprach, da nach 24 Stunden noch keine wägbaren Hypoxanthinmengen vorhanden waren, dass sie aber den Process der Hypoxanthinabspaltung doch begünstigt haben muss, da nach 14 Tagen direct grosse Mengen von Hypoxanthinsilber fällbar waren. Die in der Controlprobe der Digestion erst folgende Luft- bezw. Wasserstoffdurchleitung vermehrt die Menge der Xanthinkörper nicht mehr, erst nach dem Kochen mit Schwefelsäure gelingt es, auch in diesen Proben grössere Mengen der Xanthinkörper zu fällen.

War die Wirkung der Gährung und der Gasdurchleitung nur eine mechanische, so musste schon blosses Schütteln erfolgreich die Abspaltung der Xanthinkörper beeinflussen. Je 40 ccm Hefepresssaft wurden daher in zwei Röhren gefüllt und diese

evacuirt, um den Einfluss der Luft beim Schütteln auszuschliessen, darauf zugeschmolzen. In die Controlröhre war beim Zuschmelzen Luft gerathen. Die eine Röhre wurde bei 15° zwölf Stunden geschüttelt und zwar in einer Maschine, welche nach der Berechnung pro Stunde 25000 Touren machte, die andere Röhre ohne Schütteln als Controle bei gleicher Temperatur aufgestellt. Darauf wurden beide geöffnet und sieben Tage bei 37° in Stöpselgläsern aufbewahrt.

Tabelle IX.

	Hypoxanthin in 100 ccm in mg	
	A	B
Geschüttelte Probe	40	99
Controlprobe . . .	0	95

Es lässt sich wohl annehmen, dass bei längerer Dauer des Schüttelns die ganze Menge der Xanthinkörper in den manifesten Zustand (A) übergegangen wäre. Sicher festgestellt schien danach ein begünstigender Einfluss der mechanischen Einwirkung durch Gaseinleitung oder durch Schütteln.

Dennoch konnte man zur Erklärung dieser Erscheinungen noch keiner der beiden, schon von Salkowski vertretenen Annahmen den Vorzug geben. Es lag einerseits die Möglichkeit vor, dass die Latenz der Xanthinkörper auf der Gegenwart störender Substanzen beruht, welche vielleicht unter dem mechanischen Einfluss der Gasdurchleitung den Angriffen des Fermentes eher zugänglich gemacht werden; andererseits konnte man annehmen, dass zunächst ein Zwischenproduct des Hypoxanthins auftritt, aus welchem erst durch Säuren das Hypoxanthin abgespalten wird. Schon Salkowski neigte mehr der ersteren Erklärung zu und hatte auch den störenden Einfluss von Leimsubstanzen erkannt[1]). Auch in den vorliegenden Versuchen ist die zweite Erklärung nicht mit allen zu Tage tretenden Erscheinungen vereinbar.

1) Pflüger's Archiv 1871, Bd. 5 S. 95.

Weitere Versuche sprechen nun für die erstere Annahme, für die Gegenwart einer störenden Substanz und zwar meist der Kohlensäure und nöthigen zugleich zu einer anderen Erklärung der bisher erhaltenen Resultate.

Es wurde, anfangs lediglich zur Vervollständigung der Versuchsreihe, im gleichen Apparate wie bei den anderen Versuchen durch eine Probe Kohlensäuregas geleitet, durch die andere Sauerstoff, beide in Mengen von je 40 l in acht Stunden, worauf die Proben zwei Monate bei 37° aufbewahrt waren. Die Zahlen bedeuten stets mg Hypoxanthin %.

Tabelle X.

	A	B
1. mit CO_2-Durchleitung . . .	47	107
2. mit Sauerstoffdurchleitung .	80	—

Der Versuch wiederholt ergab nach 14tägigem Stehen:

Tabelle XI.

	A	B
1. mit CO_2-Durchleitung . . .	53	112
2. mit Sauerstoffdurchleitung .	80	112

Bei CO_2-Durchleitung waren also nur halb so viel Xanthinkörper manifest geworden als beim Durchleiten der anderen indifferenten Gase.

Wenn nun die Gasdurchleitung nur insofern gewirkt hat, als sie die entstehende Kohlensäure entfernte, musste auch ein einfaches Aufstellen im Vacuum den gleichen Erfolg haben und zugleich für den weiter oben angeführten Schüttelversuch eine Erklärung geben; dies gelang auch in folgender Versuchsreihe:

Probe I mit Kohlensäuredurchleitung,

» II mit (kohlensäurefreier) Luftdurchleitung,

» III war in einer starken, mit Schlauch und Klemmschraube verschliessbaren Röhre völlig evacuirt, wurde so constant bei 37° gehalten und zur Vorsicht täglich nachevacuirt, da auch nach mehreren Tagen

noch Gasblasen aufstiegen, wenn die Flüssigkeit vorsichtig bewegt wurde. Ein Schütteln wurde dabei möglichst vermieden. Das Antisepticum (Toluol) wurde einmal erneuert.

Probe IV wurde unter Zusatz von 0,2 % Essigsäure,

» V als Controle aufgestellt.

Nach sieben Tagen ergab die Bestimmung mg Hypoxanthin in je 100 ccm:

Tabelle XII.

	A	B
I. mit CO_2-Durchleitung . . .	69	103
II. mit Luftdurchleitung . . .	107	112
III. evacuirt	109	—
IV. mit Essigsäure	15	—
V. Controle	66	96

Bei den Versuchen zu Tabellen X, XI und XII war ein älterer Trockenpresssaft benützt worden. Solcher Trockenpresssaft wurde namentlich stets vorräthig gehalten für die weiter unten angegebenen vergleichenden Untersuchungen über hemmende und begünstigende Einflüsse auf das proteolytische Enzym. Er liess sich gewinnen, indem frischer Presssaft sogleich im Vacuum zur dünnen Extractdicke eingedampft, auf Glasplatten oder Wachspapier gestrichen, bei 22° über Nacht zu einer spröden Masse getrocknet, darauf gepulvert und im Vacuumexsiccator völlig ausgetrocknet wurde. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 14 %; doch wurde zu den Versuchen stets eine Lösung 1 : 10 benützt, welche alle Eigenschaften des ursprünglichen Presssaftes aufwies. Nur scheinen beim Lagern des Trockenpresssaftes gerade die eine Latenz der Xanthinkörper bedingenden Eigenschaften abzunehmen, wie aus den Tabellen X—XII hervorgeht, in welchen die Controlprobe resp. die Probe mit CO_2-Durchleitung immer grössere Mengen direct manifester Xanthinkörper aufweisen.

Da auch die Zymase in dieser Zeit zu Grunde ging, kann man das Fehlen einer Selbstgährung zu Anfang der Digestion, also eine verminderte Kohlensäureentwickelung sehr gut mit den

obigen Versuchen in Einklang bringen. Für die ganz aussergewöhnliche Tabelle VII bleibt dann nur die Erklärung übrig, dass durch die heftige Selbstgährung zu Anfang des Versuches, in Folge deren der Saft im offenen Gefäss sogar überschäumte, die Kohlensäure bei 37° entfernt war, bevor die Verdauung einsetzte.

Aufmerksam gemacht auf den eigenthümlichen Einfluss der Essigsäure im vorigen Versuch, welcher der erwarteten, Kohlensäure austreibenden Wirkung nicht entsprach, machte ich noch einen Versuch unter Zusatz verschiedener Agentien: In Proben frischen Presssaftes mit Essigsäure, Weinsäure, Oxalsäure, Schwefelsäure in Mengen von je 0,2%, Kaliumhydroxyd 0,1% und der Controle wurden nach siebentägiger Digestion bei 37° die Xanthinkörper direct bestimmt, bei der mit Essigsäure versetzten und der Controlprobe ausserdem auch nach Kochen mit Schwefelsäure. Man hätte bei Annahme einer ausschliesslichen Beeinflussung durch Kohlensäure erwarten müssen, dass in allen diesen Proben diese durch die zugesetzten Agentien ausgetrieben oder gebunden und so der Gehalt an manifesten Xanthinkörpern vermehrt werde. Es trat aber der entgegengesetzte Fall ein. Die Controlprobe ergab 11 mg Hypoxanthin in Procenten des Presssaftes, mit Schwefelsäure gekocht 32 mg, die Probe mit Essigsäure nach dem Kochen mit Schwefelsäure 28 mg, direct aber ebenso wie sämmtliche andere Proben gar keine Reaction. Ausserdem gelang es nicht, in einer mit Schwefelsäure gekochten Probe die manifest gewordenen Xanthinkörper durch Sättigen mit Kohlensäure bei Neutralisation der erkalteten Lösung mit Natriumcarbonat wieder latent zu machen.

Trotzdem dürfte die Summe der bisher erhaltenen Resultate wohl zu dem Schlusse berechtigen, dass die Kohlensäure, so wie sie im Presssafte allmählich bei den Hydratationsvorgängen sich entwickelt, eine der Substanzen ist, welche die directe Fällbarkeit der Xanthinkörper verhindern, und deren Entfernung durch Gasdurchleitung bezw. Schütteln im evacuirten Gefäss die Manifestirung begünstigt. Ebenso richtig ist aber wohl die Annahme, dass noch andere Substanzen, vielleicht auch physikalische Ur-

sachen eine Latenz der Xanthinkörper bedingen. Es haben diese Untersuchungen eine solche Ausdehnung angenommen, weil von Versuch zu Versuch neue Thatsachen einer einheitlichen Erklärung des Vorganges entgegentraten.

Der Phosphor, welcher im Hefepresssaft zum grössten Theil, bis auf 5%, organisch gebunden ist, wird bei der Digestion schon nach wenigen Stunden fast vollständig als Phosphorsäure abgespalten. Bei den diesbezüglichen Versuchen wurde die Phosphorsäure nach einem Verfahren bestimmt, das sich bezüglich der Enteiweissung an die Zuckerbestimmungsmethode anschloss, welche F. Schenk[1]) für das Blut angegeben hat.

Das einfache Kochen des Presssaftes oder die Fällung mit Alkohol geben ungenaue Resultate für die Phosphorsäure. Das Schenk'sche Verfahren hat den Vorzug, dass die Entfernung des Eiweisses auf kaltem Wege, d. h. durch Fällung mit Quecksilberchlorid und Salzsäure geschieht und somit eine beim Erhitzen leicht mögliche Abspaltung von Phosphor aus Hefenucleïn vermieden wird. 30 ccm Presssaft wurden auf 50 ccm verdünnt, dazu 50 ccm 2proc. Salzsäure und 50 ccm 5proc. Quecksilberchloridlösung gegeben. Das Filtrat wird durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber, durch Lufteinleiten vom Schwefelwasserstoff befreit. 100 ccm des Filtrates wurden mit Ammoniak übersättigt, mit Magnesiamischung die Phosphorsäure gefällt, der Niederschlag in Essigsäure gelöst und mit Uranlösung titrirt, von welcher 1 ccm 5 mg P_2O_5 entsprach.

Tabelle XIII.

P_2O_5 in Procenten des Presssaftes. Gesammtphosphor als $P_2O_5 = 0{,}528$.[2])

Dauer	Filtrat P_2O_5	Dauer	Filtrat P_2O_5
frisch	0,040	frisch	0,024
nach 12 Stunden	0,380	nach 6 Stunden .	0,360
» 4 Tagen .	0,392	» 20 » .	0,416
» 9 » .	0,400	» 2 Tagen .	0,412

1) Pflüger's Archiv Bd. 56 u. 57.

2) Gesammtphosphor durch Veraschen mit Na_2CO_3 u. KNO_3 bestimmt.

Gesammtphosphor als $P_2O_5 = 0{,}600$[1]).

Dauer	Filtrat P_2O_5
frisch	0,020
nach 1 h 10′ bei 39°	0,384
» 9 Tagen . .	0,506

Schon nach einer Stunde sind also $^2/_3$ der gesammten Phosphormenge in der Lösung als Phosphorsäure vorhanden. Vollständig wird der organisch gebundene Phosphor, wie es scheint, überhaupt nicht in Phosphorsäure umgewandelt, sondern $^1/_5$—$^1/_6$ bleibt in organischer Bindung.

Mit demselben Verfahren der Enteiweissung wurde auch die Schwefelsäure bestimmt:

Tabelle XIV.

SO_3 in Procenten des Presssaftes. Gesammtschwefel als $SO_3 = 0{,}077$[2]).

Dauer der Digestion bei 37°	Filtrat SO_3	Dauer	Filtrat SO_3
frisch	0,033	frisch	0,0225
nach 12 Stunden	0,050	nach 24 Stunden	0,0237
» 2 Tagen .	0,056	» 3 Tagen .	0,0267
» 4 » .	0,060	» 6 Wochen	0,0266
» 9 » .	0,059		

Hiernach steigt die Menge der Schwefelsäure nur unwesentlich an, und der organisch gebundene Schwefel geht jedenfalls nur zum kleinen Theil in Schwefelsäure über. In Uebereinstimmung damit ist Tryptophan, ein bis 2,2% Schwefel[3]) enthaltender Farbstoff, in nicht unerheblicher Menge unter den Verdauungsprodukten enthalten und alkalische Bleiacetatlösung scheidet beim Kochen mit altem Presssaft noch Bleisulfid aus.

Albumosen treten während des ganzen Spaltungsprocesses nur vorübergehend auf und in geringer Menge, echtes Pepton nachzuweisen, gelang bei der Verdauung im Brutschrank niemals. Selbst wenn man schon nach einstündiger Digestion bei 37° den

1) Gesammtphosphor durch Veraschen mit Na_2CO_3 und KNO_3 bestimmt.
2) Gesammtschwefel » » » » » » »
3) Nencki, Ber. d. d. chem. Ges. 1895, S. 560.

Verdauungsprocess durch Erhitzen abbricht, sind im Filtrate wohl schon Leucin und Tyrosin mikroskopisch nachweisbar, dagegen nur Spuren von Albumosen und kein echtes Pepton. Bei einer im Eisschrank, also bei ca. 5°, verlangsamten Verdauung konnten zwar in 100 ccm nach 14 Tagen aus dem eingedampften und von dem ausgeschiedenen Krystallbrei befreiten Filtrate durch Sättigung mit Ammonsulfat ca. 0,5 g Albumosen gefällt und isolirt werden, in dem von Ammonsulfat durch Kochen mit Baryumcarbonat befreiten Filtrate aber fiel schon die Biuretreaction negativ aus; der Gehalt an coagulirbarem Eiweiss war in dieser Zeit von 5,3% auf 1,3% gesunken.

Ein zweites Mal wurden 500 ccm Presssaft drei Wochen im Eisschrank aufbewahrt, wonach das coagulirbare Eiweiss (7,2%) ganz verschwunden war. Die Flüssigkeit wurde eingedampft, nach dem Erkalten von den zum grössten Theil aus Leucin bestehenden krystallinischen Ausscheidungen abfiltrirt, mit Ammonsulfat gesättigt und so ca. 0,4 g Albumosen erhalten. Diese charakterisirten sich zum grossen Theil als Deuteroalbumose, da sie bis auf einen minimalen Rest von concentrirter Chlornatriumlösung aufgenommen wurden und durch Essigsäure, welche mit Chlornatrium gesättigt war, in dieser Lösung ein Niederschlag entstand.

Im Filtrate von den Albumosen fiel dieses Mal die Biuretreaction schwach positiv aus, so dass eine weitere Behandlung nöthig ward. Diese wurde nach Kühne's neuerer Trennungsmethode der Peptone von den Albumosen[1]) durchgeführt und war von dem Erfolge begleitet, dass nun nach Entfernung des Ammonsulfates keine Biuretreaction mehr erhalten werden konnte, trotzdem möglichst quantitativ gearbeitet worden war.

In der Literatur finden sich gelegentlich Notizen, dass in Hefe Pepton gefunden wurde, doch ist fast stets eine weitere Angabe der Isolirungsmethode unterlassen. Bei den Untersuchungen Nägeli's und Löw's über die chemische Zusammensetzung der Hefe[2]) fand Letzterer zwar 2% Peptone, differencirt

1) Zeitschr. f. Biol. 1892, S. 1.

2) Journ. f. prakt. Chemie 1878.

diese aber noch in a-, b- und c-Pepton Meissner's, in drei Fractionen erhaltbar durch Bleiacetat, darauf Mercurinitratfällung; die letztere Fällung (c) zerlegt und mit Alkohol ausgezogen, lieferte einen darin unlöslichen, nach der Gewichtsmenge nicht bestimmten Rückstand, der Millons- und Biuretreaction gab, mit Salpetersäure und durch Essigsäure-Ferrocyankalium aber nicht fällbar war, also wohl echtes Pepton gewesen sein dürfte. Zu bemerken ist dabei aber, dass diese Untersuchung in einem, durch elfmaliges langes Kochen gewonnenen wässerigen Hefeauszug angestellt wurde und Nägeli selbst die Möglichkeit einer hydratisirenden Einwirkung des siedenden Wassers zugibt. a- und b-Pepton Meissner's haben sich bekanntlich später durch Kühne's Untersuchungen als Albumosen qualificirt. Auf diese, heute nicht mehr stichhaltigen Untersuchungen wird nun in der Literatur bei Erwähnung des Peptongehaltes der Hefe öfter hingewiesen.[1])

Um auch diese Frage hier zu entscheiden, wurden 800 g frische Hefe mit Quarzsand und Kieselguhr verrieben, dann allmählich Wasser zugefügt und der auf solche Weise kalt gewonnene Auszug bei niederer Temperatur abfiltrirt. Das klare Filtrat wurde von den reichlichen coagulirbaren Eiweissstoffen befreit und eingedampft, darauf heiss mit Ammoniumsulfat gesättigt. Es fanden sich wenig Albumosen und kein Pepton, so dass man annehmen muss, dass dieses unter normalen Umständen auch in der Hefe nicht enthalten ist.

Dass die geringe, resp. überhaupt nicht nachweisbare Menge dieser Zwischenproducte bei der Verdauung durch die Eigenthümlichkeit des proteolytischen Enzymes, nicht durch eine solche der zerlegten Eiweissstoffe bedingt wird, zeigen folgende Versuche:

Setzte man dem Hefeplasmin Pepton (puriss. Grübler) oder Albumose (aus Fibrin dargestellt) zu, im Verhältniss von 2%, so fiel die Anfangs sehr starke Biuretreaction nach drei Tagen schon negativ aus.

1) z. B Mayer, Gährungschemie 1895, S. 114 u. 115.

Ferner wurden vier Proben zur Verdauung aufgestellt, welche in folgender Weise vorbereitet waren:

A Coagulat aus 20 ccm Presssaft, gewaschen + 10 ccm frischer Presssaft,

B-Coagulat aus 30 ccm Presssaft, gewaschen + 30 ccm H_2O, + 0,3 Trypsin + 0,06 Na_2CO_3,

C-Coagulat aus 30 ccm Presssaft, gewaschen + 30 ccm H_2O, + 0,3 Pepsin + 0,06 HCl,

D-Coagulat aus 30 ccm Presssaft, gewaschen + 30 ccm H_2O, + 0,3 Papajotin + 0,03 HCl.

Nach zehntägigem Stehen bei 37° war in allen Proben das Eiweiss verdaut und zwar bei Trypsin am schnellsten. Sie gaben im Filtrate von den Albumosenfällungen folgende Reactionen:

Millonsreaction: A, B, C und D positiv,

Reaction mit Ferrocyankalium und Essigsäure: A, B, C und D negativ,

Biuretreaction: A negativ, B, C und D positiv,

Albumosen waren nur bei C und D in geringer Menge nachweisbar.

Ausserdem fiel auch in einer Probe, welche die Verdauungsproducte von Fibrin durch Hefepresssaft enthielt, die Biuretreaction negativ aus.

Verdauung anderer Eiweisskörper durch Hefepresssaft.

Wie schon eingangs erwähnt, werden zugesetzte Fibrinflocken gewöhnlich in 24 Stunden gelöst, nachdem sie in sechs Stunden schon zerfallen waren.

Auch Eieralbumin in Lösung wird zerlegt: Zu 20 ccm Presssaft mit 5,2% Coagulat wurden 20 ccm Eieralbuminlösung mit 3,5% coagulirbarem Eiweiss gegeben, so dass die Menge des Coagulates in der Mischung im Ganzen 4,35% betrug. Nach dreitägigem Stehen bei 37° wurden nur noch 2%, nach sechs Tagen nur noch 1,38% Coagulat gefunden. Da die Menge des coagulirbaren Hefeeiweisses nur 2,6% betrug, aber im Ganzen 2,97% verdaut waren, muss 0,37% Eiereiweiss zerlegt worden sein, oder 21% der zugesetzten Eiereiweissmenge.

Noch besser fiel ein zweiter Versuch aus: Es wurde eine filtrirte Eiweisslösung aus trockenem Eiereiweiss hergestellt von 1,64% Coagulatgehalt; der Hefepresssaft enthielt frisch 4,83%.

Nun wurden folgende Proben bei 37° aufgestellt:

A 5 ccm Presssaft + 5 ccm Wasser,
B 10 » » + Eiweiss, aus 10 ccm Eieralbuminlösung durch Coagulation erhalten und gewaschen,
C 10 » » + 10 ccm Eieralbuminlösung,
D 10 » Wasser + 10 » »

nach 14 Tagen ergaben in Procenten der Proben:

A 0,04 Coagulat, 1,03 Filtratstickstoff (= 6,44 Eiweiss)[1],
B 0,08 » 1,254 » (= 7,81 Eiweiss)
C 0,56 »
D 1,57 »

Als Differenz des aus dem Filtratstickstoff zu berechnenden, in Lösung gegangenen Eiweisses bei A und B ergibt sich 1,37%, also annähernd die ganze Coagulatmenge der Eieralbuminlösung. Auch Probe C (Albuminlösung + Presssaft) zeigt gegen Probe D (Albuminlösung allein) eine Abnahme von 1,0% oder 60% der Eieralbuminmenge.

Des weiteren wurden noch folgende Eiweissstoffe der Verdauung durch Hefepresssaft unterworfen: Caseïn, Glutencaseïn und Legumin (Präparate von Grübler) in Mengen von je 0,5 g zu je 10 ccm Trockenpresssaftlösung (1 : 10) zugesetzt, ergaben nach sieben Tagen: Die Probe mit Caseïn 0,1 g Coagulat, die mit Glutencaseïn 0,14 g, die mit Legumin noch 0,18 g, so dass auch diese Körper als der Verdauung durch Hefepresssaft zugänglich erachtet werden müssen. Nucleïn im Verhältniss von 2% zu Hefepresssaft zugesetzt, ergab nach sieben Tagen nur mehr Spuren von Coagulat. Die durch Magnesiamischung direct fällbare und dann mit Uranacetatlösung titrirte Phosphorsäuremenge im Filtrate war von 40 mg % auf 390 mg gestiegen, während sie in der ebenso behandelten Controlprobe mit Nucleïn allein nur 10 mg betrug und für eine Trockenpress-

1) Durch Multiplication des Filtratstickstoffs mit 6,25 erhalten.

saftlösung 1 : 10 nach früheren Bestimmungen ca. 280 mg sich berechnen lassen.

Caseïnverdauung durch Hefe hat schon Boullanger[1]) und Beyerinck[1]) constatirt; Letzterer auch betreffs Gluten, Albumin und Fibrin das gleiche Resultat erhalten.

Begünstigende und hemmende Einflüsse.

Um über die Natur des proteolytischen Enzymes Aufschlüsse zu erhalten, musste es von besonderem Werthe sein, dessen Wirkungsweise unter den verschiedensten Bedingungen zu studiren und die dabei gewonnenen Erfahrungen mit denen zu vergleichen, welche an anderen Verdauungsenzymen erhalten waren. Zu beachten ist dabei allerdings, dass bei allen Versuchen die Eiweissstoffe des Presssaftes zugegen waren und dem Enzym einen gewissen, wenn auch sicher geringen Schutz gegen Beeinflussung gewährten.

Das Temperatur-Optimum und -Maximum für die Digestion sollen folgende Versuche demonstriren:

Tabelle XV.

Temperatur	Coagulat in Procenten	
	vor der Digestion	nach 20stündiger Digestion
1. bei + 3° bis 7°	2,72	2,57
2. » + 22°	4,71	3,93
3. » + 37°	4,71	2,71
4. » + 48°	4,71	2,42

Tabelle XVI.

nach einstündigem Erhitzen auf	Coagulat in Procenten	
	vor der Digestion	nach 20stündiger Digestion bei 37°
1. 50°	3,4	1,36
2. 55°	3,4	1,99
3. 60°	3,4	3,36
4. nicht erhitzte Controlprobe zu 1—3	3,4	0,69
5. 65°	2,72	2,57
6. nicht erhitzte Controlprobe zu 5	2,72	0,87

1) a. a. O.

Niedere Temperatur hemmt also die Verdauung; doch kann diese in genügend langer Zeit auch bei $+3^0$ bis $+7^0$ zu Ende geführt werden, wie die Versuche zum Nachweis des Peptons beweisen[1]).

Die günstigste Temperatur scheint zwischen 40—45° zu liegen. Verlangsamend wirkt schon eine Temperatur von 50°, vernichtet wird das Enzym bei einstündigem Erhitzen auf 60°. Aus praktischen Gründen wurden in der Regel die Versuche bei einer Temperatur von 37° ausgeführt. Als bei dieser Temperatur stehende Presssäfte in ihrer Wirkung auf Fibrin und Thymolgelatine von Zeit zu Zeit geprüft wurden, zeigte sich auffallender Weise, dass das proteolytische Enzym, allmählich schwächer werdend, nur 9 — 15 Tage seine Wirksamkeit bewahrte.

Nachdem im Jahre 1898 H. Will[2]) auf Grund eingehender Versuche die Behauptung aufgestellt hatte, dass die Proteolyse der lebenden Hefezellen neben dem Mangel an gelöster Nahrung überhaupt, speciell an stickstoffhaltiger, durch den Sauerstoffmangel begünstigt werde, erschien es nothwendig, auch den Einfluss der Luft auf die Proteolyse festzustellen, um zu erfahren, ob ein reichlicher Luftzutritt die Thätigkeit des Fermentes hindernd beeinflusst. Es wurden im Allgemeinen drei Proben angesetzt: Die eine wurde ohne Gasdurchleitung bei 37° digerirt (Controle), durch die zweite wurde während der Digestion bei gleicher Temperatur Luft geleitet, durch die dritte Wasserstoff. Die Menge der durchgeleiteten Gase war annähernd gleich: Bei Versuch I (Tabelle XVII) betrug sie 12 l auf zwölf Stunden vertheilt, bei Versuch II wurden 20 l in der ersten Stunde und 20 l auf die folgenden 23 Stunden vertheilt durchgeleitet. Die Zahlen in den Tabellen entsprechen dem Coagulat in Procenten des Presssaftes.

1) S. 23.

2) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1898, Nr. 21.

Tabelle XVII.

Probe	I. frisch	nach 12stünd. Digestion	II. frisch	nach 24stünd. Digestion
1. Controle	5,2	2,77	7,05	1,17
2. bei Luftdurchleitung	5,2	2,03	7,05	1,91
3. bei Wasserstoffdurchleitung	5,2	2,44	7,05	2,43

III. 1. mit Luftdurchleitung nach 21 Stunden 0,55% Coagulat,
2. » Wasserstoffdurchleitung nach 21 Stunden 0,87% Coagulat.

IV. Probe	frisch	nach 8stünd. Digestion
1. mit Sauerstoffdurchleitung	4,7	2,6
2. mit Kohlensäuredurchleitung . . .	4,7	2,83

Wie ersichtlich, hatte der Sauerstoff eher fördernd als hindernd auf den Ablauf der Proteolyse gewirkt: Das Coagulat ist nach 8—24 Stunden in den mit Luft oder reinem Sauerstoff behandelten Proben immer geringer als in den mit Wasserstoff oder Kohlensäure behandelten, in einem Falle, wo allerdings die Temperatur um einige Grade höher gestiegen war, auch geringer als in der Controlprobe. Demnach ist also jedenfalls für das einmal vorhandene Ferment die directe Einwirkung des Sauerstoffes belanglos. Die Möglichkeit des indirecten Einflusses des Sauerstoffes auf die Proteolyse soll weiter unten erörtert werden.

Verschiedene Antiseptica wirkten bei Zusatz der gewöhnlich angewendeten Mengen nicht hemmend, wenigstens trat ein bemerkenswerther Unterschied zwischen den einzelnen Proben im Vergleich zu der mit Chloroform versetzten nicht auf.

Tabelle XVIII.

frisch	Coagulat nach 2 Tagen bei 37°			
	0,5% Chloroform	0,5% Thymol	5% Toluol	0,2% Salicylsäure
5,0	0,2	0,49	0,25	0,2

Phenol 3‰ und Sublimat 1‰ hoben natürlich in Folge der starken Fällungen die Verdauung auf. Formaldehyd beeinflusst in einer Menge von 0,5% die Proteolyse schon nachtheilig (0,6% Coagulat), bei 0,1% dagegen war noch kein Unterschied von dem Ergebniss der Controlprobe (0,29% Coagulat) zu verzeichnen.

Als diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung von Fermenten hat Schär[1]) in Bestätigung früherer Versuche Schönbein's angegeben, dass Blausäure in Mengen von 1—2‰ eine hemmende Wirkung auf das katalytische Vermögen einiger Fermente ausübt. Dass die proteolytische Wirksamkeit der Fermente einer so starken Beeinflussung durch Blausäure nicht unterliegt, geht unter Anderem aus den Mittheilungen von Vines[2]) über das proteolytische Enzym von Nepenthes hervor, das noch in Gegenwart von 1% Blausäure verdaut. Weiter hat Schützenberger[3]) constatirt, dass bei Zusatz von 0,7‰ Blausäure Pepsin die zehnfache (trocken) Menge Fibrin in fünf Tagen bis auf 4% verdaut. Auch das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes wird durch 1% Blausäure in seiner Wirksamkeit nur geschwächt, aber nicht völlig gehemmt, und selbst diese Schwächung kann auf die Wirkung der in verhältnissmässig grosser Menge zugesetzten Säure als solcher zurückgeführt werden. Während in einer Controlprobe ohne Blausäure nach 24stündiger Digestion von 6,4% Coagulat nur noch 1,3% unverdaut vorhanden waren, sank in einer zweiten Probe mit 1% Blausaure die Menge des Coagulates immerhin noch auf 2,44% und in einer dritten Probe, aus welcher die Blausäure durch Erwärmen und Luftdurchleiten völlig entfernt war, auf 1,23%.

Neutralsalze wirken begünstigend auf die Wirkung des proteolytischen Enzymes und es ist beachtenswerth, dass sie auch in concentrirterer Lösung, ohne übrigens die Reaction zu beeinflussen, diesen günstigen Einfluss beibehalten. Das Coagulat

1) s. u. A. Festschrift, 1891, Zürich, Alb. Müller.
2) Annales of botany 1897.
3) Compt. rend. T. 115 p. 208.

betrug nach der Digestion bei 37° in Procenten des aus frischem Presssaft erhaltenen Coagulates:

Versuch I nach 20stündiger Digestion,	Controle	9,1
	NaCl 0,7 %	7,5
	NaCl 3 %	7,3.
Versuch II nach 36stünd. Digestion,	Controle	4,6
	KNO_3 1 %	2,2
	KNO_3 10 %	0,2
	KNO_3 fast gesättigt .	2,5 [1]
	NH_4Fl 1 %	2,5
	NaFl 1 %	21,8.
Versuch III nach 17stünd. Digestion,	Controle	33,2
	KNO_3 gesättigt . .	72,2 [1]
	NaCl » . .	78,5
	$(NH_4)_2SO_4$ gesättigt .	78,5.
Versuch IV nach 18stünd. Digestion,	Controle	23,6
	KJ 2 %	10,3 [2]
	KJ 5 »	4,3.

Glycerin und Rohrzucker hemmen bei Zusatz grösserer Mengen die Verdauung:

nach 20stündiger Verdauung,	Controle	9,1
	Glycerin 50 % . . .	63,6
	Rohrzucker 50 % . .	30,7.

Die conservirende Wirkung dieser Agentien, sonst als antibacterielle vielfach in Anwendung gezogen, beruht also im Presssaft auf einer erheblichen Behinderung der Proteolyse; für Rohrzucker, in grösserer Menge zugesetzt, hat ausserdem Hans Buchner[3]) eine specifische erhaltende Wirkung auf die Zymase angenommen.

Die Behinderung der Proteolyse, der Hydratisirung der Eiweissstoffe, ist in diesem Falle wohl auf Beschlagnahme des

1) Uebereinstimmend mit Beobachtungen an Bacterien und Trypsin von Ph. Limbourg, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1889, S. 454, und Neumeister, Lehrbuch f. physiol. Chemie S. 76 u. 198.

2) Also begünstigend, während beim Magensaft durch dieselben Mengen eine verdauungshemmende Wirkung beobachtet wurde von S. Fabini und G. M. Fiori, Moleschott's Unters. Bd. 12 S. 462, Sansoni e Battistini, Riv. chim. T. 90 p. 575.

3) Münch. med. Wochenschr. 1897, S. 299.

nöthigen Wassers durch den gelösten Zucker oder das hygroskopische Glycerin zurückzuführen. Es spricht dafür der Umstand, dass schon blosses Concentriren des Presssaftes den gleichen Effect zur Folge hat.

750 ccm frischer Presssaft wurden im Vacuum zu einem anderen Zwecke auf 250 ccm, also auf $^1/_3$ Volumen concentrirt und hatten in Folge dessen immer noch die Consistenz eines dünnen Syrups. Eine Probe davon, 18 Stunden bei 37° aufgestellt, lieferte noch 70% des ursprünglichen Coagulates, während die wieder auf das ursprüngliche Volumen verdünnte Controlprobe unter den sonst gleichen Bedingungen nur mehr 20% des ersten Coagulates aufwies.

Andererseits enthielt ein Presssaft, im Verhältniss 1 : 10 mit destillirtem Wasser verdünnt, nach 24 Stunden noch 1,7% Coagulat, 1 : 20 verdünnt noch 1,6%, während der Gehalt an coagulirbarem Eiweiss in der Controlprobe von 7,05% auf 1,2% gesunken war, so dass also auch bei starker Verdünnung eine Herabminderung der Proteolyse nicht erkennbar ist.

Bei der steten Gegenwart von Alkohol in Hefeculturen musste auch die Frage interessiren, ob und in welchem Grade der Alkohol das proteolytische Enzym beeinflusst. Im Allgemeinen konnte eine hemmende Wirkung vorausgesetzt werden; doch ist andererseits auch von einigen Verdauungsenzymen bekannt, dass sie noch bei grösserem Alkoholgehalt der Verdauungsflüssigkeit eine Wirkung zeigen. Die folgende Versuchsreihe beantwortet diese Frage dahin, dass ein Alkoholgehalt von 5% die Proteolyse schwach hemmt, ein solcher von 10—20% schon erheblich behindert und 30% Alkoholzusatz die Proteolyse aufhebt.

Die Coagulate betrugen in Procenten des Coagulates im frischen Presssafte nach 20stündiger Verdauung in den einzelnen Proben:

Controle	14,8,
Alkohol 5%	26,3,
» 10 »	70,3,
» 20 »	85,0,
» 30 »	100,0.

Weitaus das meiste Interesse bei einem Versuche zur Charakterisirung des Enzymes mussten aber die Ergebnisse der folgenden Versuchsreihen beanspruchen, bei denen der Einfluss von Säuren und Alkalien berücksichtigt wurde; die erhaltenen Resultate sind auch hier angegeben in Procenten des vor der Verdauung im frischen Presssafte erhaltenen Coagulates und waren alle mit Lösungen des nämlichen Trockenpresssaftes erhalten worden. Es braucht wohl nicht erwähnt zu werden, dass sämmtliche Proben vor der Coagulation neutralisirt und sodann mit wenigen Tropfen 1 proc. Essigsäure angesäuert im Wasserbade coagulirt wurden.

Versuch I nach 18 stünd. Digestion:	Controle	32,1
	HCl 0,1 %	14,1
	HCl 0,5 »	57,6
	HCl 1,0 »	90,0.
Versuch II nach 17 stünd. Digestion:	Controle	38,1
	HCl 0,05 % . . .	19,2
	HCl 0,1 » . . .	13,8
	HCl 0,2 » . . .	11,2.
Versuch III nach 18 stünd. Digestion:	Controle	31,6
	HCl 0,2 %	7,8
	HCl 0,3 »	21,2.

Versuch IV nach 18 stündiger Digestion mit 0,2 % HCl äquimolecularen Mengen von:

Essigsäure	5,0
Schwefelsäure . .	8,0
Phosphorsäure . .	13,6
Metaphosphorsäure .	13,0
Controle	31,6.

Versuch V nach 16 stünd. Digestion:	Controle	37,4
	HCl 0,3 % (tot. 0,6 %)	65,4 [1]
	HCl 0,4 » (» 0,8 »)	84,5.
Versuch VI nach 16 stünd. Digestion:	Controle	37,4
	Borsäure 1 % . . .	35,6
	Natriumborat neutral 1 %	24,7
	Borax 1 %	75,6.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, dass saure Reaction die Proteolyse begünstigt; das Optimum des Säurezusatzes wird

1) Durch Mischen von 10 ccm Saft und 10 ccm 0,6 resp. 0,8 proc. HCl.

geboten durch 0,2 % Salzsäure. Schwefelsäure in äquimolecularer Menge wirkt gleich günstig, Essigsäure sogar in höherem Grade.

Versuch V, bei dem trockener Presssaft in 0,2 % HCl gelöst wurde, soll eine fehlerhafte Anordnung A. Wroblewski's[1]) zur Anschauung bringen. Wroblewski glaubte, in seinen Untersuchungen »über den Hefepresssaft« auf Grund eines ebensolchen Versuches eine nachtheilige Wirkung der Salzsäure auf die Proteolyse feststellen zu müssen. Eine seiner Proben zwecks Carminfibrinverdauung war mit dem gleichen Volumen 0,56 proc. Salzsäure versetzt, so dass wohl eine 0,28 proc. Lösung entstand, aber die doppelte Menge der Säure in ihrer Wirkung auf das im gleichen Volumen Presssaft enthaltene Enzym zur Geltung kam. Er constatirte daher, analog dem vorliegenden Versuchsresultate eine nachtheilige Wirkung. Es wurde überdies auch bei einem Versuche mit Carminfibrin und 0,2 proc. Salzsäure ein den Versuchen II und III analoges Resultat erhalten.

Versuch VI ist insofern sehr instructiv, als er mit den Verbindungen des gleichen Elementes (Bor) die Wirkung der Säure, des Neutralsalzes und des basischen Salzes demonstrirt. Die hemmende Wirkung des letzteren steht im Einklang mit folgenden, unter Zusatz von Alkalien erhaltenen Resultaten; die Zahlen entsprechen ebenfalls dem Coagulatrest nach der Verdauung, ausgedrückt in Procenten des Coagulates vor der Verdauung (5,5 %).

Versuch I nach 20 stündiger Digestion:	Controle	22,6
	neutralisirt mit Soda (0,4 % nöthig) . .	40,4
	Soda 1 %	66,6[2])
Versuch II nach 17 stünd. Digestion:	Controle	28,1
	neutralisirt mit Soda	43,0
	Soda 0,2 % . . .	59,2
	Soda 0,5 » . . .	72,3.
Versuch III nach 22 stünd. Digestion:	Controle	15,6
	neutralisirt m. KOH (3,7 ccm $^1/_{10}$ N KOH %)	40,0
	KOH 0,1 % . . .	53,8
	KOH 0,5 » . . .	70,1.

1) Anz. d. Akad. d. Wiss. zu Krakau, Nov. 1898.

2) Die Alkalien wurden in der angegebenen Menge zu dem neutralisirten Presssafte zugesetzt.

Versuch IV nach 19stünd. Digestion: Controle 25,0
neutralisirt m. NH_3 34,0
NH_3 0,05% . . . 61,8
NH_3 0,1% . . . 82,7.

Schon eine Neutralisation des stets schwach sauren Presssaftes bedingt eine Hemmung und noch mehr ein Zusatz der Alkalien von 0,1—0,2%. Ammoniak und Caliumhydroxyd entsprechen sich in ihrer Wirkung, Natriumcarbonat wirkt etwas weniger schädlich. Das proteolytische Enzym wird also in schwach saurer Lösung begünstigt, in neutraler oder schwach alkalischer gehemmt. Beyerinck[1]) hat bei seinen Versuchen mit Hefeculturen auf verschieden reagirender Gelatine gerade entgegengesetzte Resultate erhalten. Doch ist dieser Gegensatz nur ein scheinbarer. An der Unzweideutigkeit der vorliegenden wird dadurch nichts geändert. Eine Erklärung für sie werde ich weiter unten finden bei Besprechung der von Beyerinck aufgestellten Hypothese der Enzymbildung.

Charakterisirung des proteolytischen Enzymes der Hefe.

Die letzten Versuche, zusammen mit mehreren früheren Beobachtungen, lassen es wünschenswerth erscheinen, die gefundenen Resultate im Vergleich mit den bei anderen Verdauungsfermenten schon bekannten zu einer Charakterisirung des proteolytischen Enzymes der Hefe zu verwerthen; gerade die Beeinflussung der Fermente durch Säuren und Alkalien ist ja stets wesentlich für die Charakterisirung derselben verwerthet worden.

Man unterscheidet erstens solche Enzyme, die in schwach saurer Lösung, bei einem Optimum von 0,2—0,4% Salzsäure ihre Wirkung am kräftigsten entfalten. Der typische Repräsentant dieser Gruppe, das Pepsin, wird durch die verdünntesten Lösungen der Alkalicarbonate schnell zerstört und auch bei Gegenwart von Salzen sehr gehindert[2]). Die Spaltung der Eiweisskörper schliesst mit der Bildung von Peptonen ab. Das

1) C. f. Bact. 1897, II. Abth. S. 521.
2) Neumeister, a. a. O. S. 140.

eiweissverdauende Enzym der Insectivoren (Drosera, Nepenthes etc.) schien nach den Untersuchungen A. Hansen's[1]) und vor ihm Darwin's mit Pepsin identisch zu sein, während neuere Untersuchungen von Vines[2]) nachweisen, dass es sich wenigstens in Bezug auf die Verdauungsproducte von diesem unterscheidet, da auch Leucin und Tyrosin neben viel Deuteroalbumose entsteht. Auch das betreffende Enzym der Pilze gehört dieser Gruppe angeschlossen; denn es wird das Enzym von Penicillium[3]) durch Säuren nicht geschädigt, das von Polyporus sulfureus[4]) begünstigt. Das proteolytische Enzym keimender Samen verdaut nach Green ebenfalls in saurer Lösung am besten, wobei wiederum eine verhältnissmässig grosse Menge von Albumosen nebst Pepton, Leucin und Tyrosin gebildet wird.

Diesen Enzymen, welche nach der Begünstigung ihrer Wirkung durch saure Reaction zu den peptischen zu rechnen sind, stehen die tryptischen gegenüber, deren Wirksamkeit in schwach alkalischer Lösung, namentlich bei 0,2—0,4 % Soda gefördert wird. Das charakteristische animalische Ferment dieser Gruppe, das Trypsin, zerlegt die Hälfte der zuerst gebildeten Peptone (das Hemipepton) weiter in Amidosäuren etc. Ihm scheint das proteolytische Encym der Bacterien zu entsprechen; beide werden auch in ihrer Wirksamkeit durch Sättigung der Lösungen mit Salzen nur gehemmt, nicht völlig gehindert[5]). Das Papajotin, das Enzym des Milchsaftes von Carica Papaja, verdaut Eiweissstoffe ebenfalls bei neutraler oder schwach alkalischer Reaction am besten, vermag auch Peptone zum Theil in Amidosäuren etc. zu spalten; die Uebereinstimmung mit Trypsin ist aber keine vollständige, da nach Neumeister[6]) die ersten Zwischenproducte vor der Peptonisation andere sind als beim Trypsin. Der Milchsaft von Ficus Carica verdaut in schwach alkalischer, neutraler und schwach saurer Lösung

1) Hansen, Arbeiten a. d. bot. Institut zu Würzburg Bd. 3 Heft 2.
2) Annales of botany 1898, p. 545.
3) Hansen, Flora 1889, S. 88.
4) J. Hjort, Centralbl. f. Phys. Bd. 10 S. 192.
5) Neumeister, a. a. O. S. 76 u. 198.
6) Zeitschr. f. Biol. 1890, S. 57 und a. a. O. S. 107.

Eiweissstoffe gleich gut und vereinigt dadurch die Eigenschaften des Pepsins und Trypsins.

Pfeffer[1]) konnte also mit Recht darauf hinweisen, dass auch die vegetabilischen Organismen ungleichartige proteolytische Enzyme zu produciren scheinen.

Stellt man nun Vergleiche an zwischen den eben beschriebenen charakteristischen Merkmalen dieser zwei, auf Grund des optimalen Säure- oder Alkalizusatzes aufgestellten Gruppen und den Erfahrungen, welche die bisherigen Untersuchungen des proteolytischen Enzymes der Hefe zu Tage gefördert, so zeigt sich, dass wir in diesem ein ganz neuartig wirkendes Verdauungsferment kennen gelernt haben:

Das proteolytische Enzym der Hefe wirkt am kräftigsten bei saurer, ist gehemmt bei alkalischer Reaction; es entspricht in dieser Beziehung (aber auch nur theilweise, da Pepsin durch Alkalien zerstört wird) den peptischen Enzymen.

Die Hydratation der Eiweissstoffe ist hier aber nicht beendet mit der Peptonbildung, sondern tiefgreifender unter Entstehung von Amidosäuren, Xanthinkörpern, Tryptophan etc., sodass die Uebereinstimmung darin mit Trypsin eine grosse zu sein scheint. Eine Vereinigung dieser beiden Eigenschaften ist übrigens, wie oben bemerkt, bei diesen sauer wirkenden Enzymen des Pflanzenreiches sehr häufig, so dass Vines[2]) zu dem Schlusse kam, dass es »ein Charakteristicum aller pflanzlichen proteolytischen Enzyme zu sein scheine, immer, sei es bei alkalischer oder saurer Reaction, tryptische Verdauungsproducte zu liefern«.

Aber mit keiner der beiden Gruppen lässt sich das Verhalten des Hefeenzymes gegen Albumosen und Peptone in Einklang bringen, da nach beendeter Verdauung bei Pepsin die sämmtlichen Producte, bei Trypsin wenigstens die Hälfte, als Peptone erhalten werden, während hier schon intermediär neben sehr wenig Albumosen keine nachweisbaren Mengen von Peptonen auftreten und noch weniger in dem verdauten Presssafte

---

1) Pflanzenphysiologie, II. Aufl. Bd. 1 S. 512.
2) a. a. O. Resumé.

Albumosen oder Peptone gefunden werden können. Eine derartig vollständige Verdauung wurde bisher bei keinem Enzyme erhalten.

Versuche zur Isolirung des Enzymes.

In der achtfachen Menge absoluten Alkohols kann das proteolytische Enzym, zugleich mit dem Eiweiss, ausgefällt werden. Der Niederschlag beträgt 10–12% des Saftes, er löst sich nur zum kleineren Theile wieder in Wasser und kann aus dieser Lösung wiederum mit der achtfachen Menge Alkohols ein Niederschlag erhalten werden, der nun ziemlich übereinstimmend 2% des angewendeten Saftes beträgt. Soll das Enzym so lange seine Wirksamkeit bewahren, so muss der Niederschlag jedes Mal mit absolutem Alkohol mehrmals gewaschen und dadurch völlig entwässert, darauf möglichst schnell abgepresst, durch Abreiben im Mörser gepulvert und sogleich im Vacuumexsiccator getrocknet werden. Bei der nochmaligen Aufnahme mit Wasser bleibt wiederum ein kleiner Theil unlöslich. Die Möglichkeit, nach der Selbstverdauung dieses oder des ersten Niederschlages kleinere Mengen des Enzymes in relativ reinem Zustande zu isoliren, scheitert an der Widerstandsfähigkeit des Invertins, welches der Verdauung ebenso lange widersteht, als das proteolytische Enzym seine Wirksamkeit bewahrt, also ein bis zwei Wochen.

Eine Reihe von Vorversuchen zur Trennung des Invertins und Verdauungsenzymes liessen die betreffenden Methoden erfolglos erscheinen. So waren noch in Auszügen von Trockenpresssaft mittels 50proc. Alkohol proteolytisches Enzym und Invertin nachweisbar, als diese Auszüge mit absolutem Alkohol gefällt und der Niederschlag mit Wasser aufgenommen war. Fractionirte Behandlung mit Essigsäure führt ebenfalls nicht zum Ziele. Die Vernichtungstemperaturen der beiden Enzyme liegen auch zu nahe bei einander (nach A. Mayer[1]) 52° für Invertin), um für Beseitigung des einen ohne Schwächung des anderen anwendbar zu sein. Es wurde sogar der Versuch ge-

1) Lehre von den chem. Fermenten, Heidelberg 1882.

macht, den lebenden Hefezellen durch öfteres Auslaugen das Invertin zu entziehen, bis die Auszüge keine invertirenden Eigenschaften mehr aufwiesen. Doch besass auch der aus dieser Hefe gewonnene Presssaft noch starke Invertinwirkung neben der besonders starken proteolytischen Wirkung; der sehr hohe Eiweissgehalt von 7,6% war in 18 Stunden auf 1,7% gesunken. In der Lösung des zweiten Alkoholniederschlages wird durch Sättigung mit Ammonsulfat eine Fällung erzeugt, welche abfiltrirt und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, darauf wieder in Wasser gelöst, ebenfalls proteolytische und invertirende Eigenschaft besass. Es gelang bisher nur einmal, eine sehr geringe Menge einer gut verdauenden und nicht invertirenden hygroskopischen Substanz zu erhalten, als die Alkoholfällung mit der von Hammarsten zur Trennung des Labfermentes und Pepsins benützten fractionirten Bleiacetatfällung combinirt wurde. Das Verfahren war folgendes:

700 ccm Presssaft wurden im Vacuum auf ca. 200 ccm eingedampft und diese langsam unter Umrühren in eine Mischung von 1800 ccm 95proc. Alkohols und 200 ccm Aethers gegossen. Der Niederschlag wurde sogleich abfiltrirt, zweimal mit absolutem Alkohol gewaschen, nach dem Abtropfen desselben in ein Leintuch gegeben und (ohne Filter) bei 150 Atmosphären abgepresst, sogleich in einer auf 37° erwärmten Reibschale zu einem trockenen Pulver verrieben und im Vacuumexsiccator aufbewahrt. Ausbeute 80 g. Am anderen Tage wurde das gelblichweisse leichte Pulver mit der fünffachen Menge Wassers angerieben, eine Stunde bei 37° aufgestellt und die Flüssigkeit sofort im Eisschrank abfiltrirt; nach Wiederholung dieses Verfahrens und dem Nachwaschen des Rückstandes mit Wasser resultirte eine grünlichgelbe Lösung, welche, im Vacuum concentrirt und wieder mit acht Theilen Alkohol und einem Theil Aether gefällt, einen reichlichen Niederschlag gab; nur war es dieses Mal nöthig, sechs- bis achtmal mit absolutem Alkohol nachzuwaschen, um statt des sonst zähen hygroskopischen ein sprödes, körniges Präparat zu erhalten, welches, abgepresst, getrocknet und darauf verrieben, 14 g eines weissen lockeren Pulvers darstellte. Es löst sich in

Wasser zum grössten Theil wieder auf. Diese Lösung wurde in vier Fractionen mit neutraler Bleiacetatlösung gefällt, die Niederschläge gewaschen und einzeln in viel Wasser aufgeschlemmt, um den Einfluss der nun frei werdenden Essigsäure möglichst zu mildern, darauf mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Filtrate durch Lufteinleiten vom Schwefelwasserstoff befreit. Die von dem geringen Niederschlag IV so erhaltene Lösung verdaute Fibrin, ohne Rohrzucker zu invertiren, die anderen drei Niederschläge aber enthielten ebenso wenig, wie bei früheren und späteren Versuchen alle Fällungen, das proteolytische oder invertirende Enzym allein, sondern stets gemengt.

Filtrat IV wurde also im Vacuum concentrirt, mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols gefällt, die geringe äusserst hygroskopische Fällung durch ein dichtes Filter abgesaugt, aus dem abgepressten und getrockneten Filter mit wenig destillirtem Wasser das Enzym ausgezogen und im Vacuum bei 37—40° zur Trockne gebracht. So wurde ca. 0,1 g einer zähen hygroskopischen gelben Substanz gewonnen.

Ein kleiner Theil davon, in 5 ccm Wasser gelöst, brachte 0,73 g feuchtes Fibrin (= 0,226 trockenes), welches mit der Enzymlösung einen dicken Brei bildete, nach 16 Stunden in Lösung. Die Ränder der Fibrinflocken waren schon nach drei Stunden deutlich angegriffen. Die Verdauungsflüssigkeit blieb aber milchig trübe und ergab beim Coaguliren nach fünf Tagen noch 0,127 Coagulat, so dass 50% obigen Fibrinquantums von der minimalen Enzymmenge verdaut waren. Ausserdem ergab eine quantitative Bestimmung in 0,500 Rohrzucker + 5 ccm Wasser und 0,5 ccm der gleich starken Enzymlösung nach 24 Stunden bei 37° nur 0,018 Invertzucker.

Die Substanz stellte also das proteolytische Enzym mit einer verschwindend geringen Beimengung von Invertin dar und gab folgende Reactionen:

Gerbsäure	kaum erkennbare Trübung,
Phosphorwolframsäure . .	kaum erkennbare Opalescenz,
Ammoniummolybdat . . .	deutliche Opalescenz, beim Erhitzen erst gelbgrüne Lösung, dann ebensolche Trübung,

Salpetersäure	farblos klar,
Jodjodkalium	keine Reaction,
Quecksilberjodidjodkalium .	keine Reaction,
Biuretreaction	negativ,
Millons-Reaction	negativ,
$HgCl_2$ (5 %)	starke Opalescenz,
Bleiacetat	weisse undurchsichtige Fällung,
Mercurinitrat	weisse undurchsichtige Fällung,
Aetheralkohol	undurchsichtige Trübung,
Erhitzen	Trübung und dann deutlich flockiges Coagulat.

Es war also eine beim Erhitzen noch gerinnende, nur mehr mit Alkohol, Bleiacetat, Mercurichlorid, Mercurinitrat und Sättigen mit Ammonsulfat (siehe oben) fällbare Substanz, welche keine Millon'sche und keine Biuretreaction mehr gab, verdaute und nicht invertirte.

In drei übereinstimmenden Versuchen wurde die concentrirte und kräftig verdauende Lösung des zweiten Alkoholniederschlages in Pergamentpapier von 0,15 mm Dicke der zwei- bis dreitägigen Dialyse gegen destillirtes Wasser und einmal gegen 5% Salpeterlösung unterworfen. Das Dialysat invertirte Rohrzucker immer stark, ohne proteolytische Eigenschaft gegen Fibrin oder Thymolgelatine zu besitzen, so dass dieser Versuch zu gleicher Zeit ein Beweis ist für die Dialysirbarkeit des Invertins und dafür, dass das proteolytische Enzym durch Pergamentpapier nicht dialysirt.

Im Gegensatze dazu fand Beyerinck[1]), dass »das ‚Hefetrypsin' durch Agarplatten und Pergamentpapier sehr leicht diffundire und im Substrate sich ungefähr mit der Geschwindigkeit der reinen Peptone fortbewegt«. Eine Erklärung dieser entgegengesetzten Resultate zu geben, ist ohne weiteres nicht möglich, umsomehr da Beyerinck keine näheren Angaben über die Versuchsanordnung gemacht hat.

---

1) a. a. O.

Unter welchen Bedingungen bildet sich das Enzym bezw. tritt es in Wirkung?

Die Beantwortung dieser Frage wurde, wie eingangs erwähnt, schon von verschiedenen Forschern versucht und zeigte, dass deren Ansichten durchaus nicht übereinstimmen.

Besonders eingehende Versuche hat H. Will in der schon öfter citirten Abhandlung veröffentlicht und zugleich eine Anschauung geäussert, welcher auf Grund der bei den vorliegenden Arbeiten gesammelten Erfahrungen nicht beigepflichtet werden kann. Die Widerlegung seiner Anschauungen lässt sich am besten an der Hand der Resultate durchführen, welche Will mit grosser Sorgfalt aus sehr zahlreichen Versuchen für seine Theorie gesammelt hat, die deshalb auch zunächst näher dargelegt werden sollen:

Will machte seine Studien anfangs an Stichculturen in 10% Bierwürzegelatine und dehnte die Versuche auf möglichst zahlreiche Saccharomycesarten aus. Bei 20° C. trat eine Verflüssigung innerhalb 18—80 Tagen, bei 13° innerhalb 45—240 Tagen ein und zwar in der Regel im Stichcanal beginnend. Eine Zusammenstellung seiner Versuche führte zu dem Ergebniss, dass allgemein die schneller verflüssigenden Arten (Mycoderma- und Anomalusarten) auch sauerstoffbedürftigere sind. Bei späteren Versuchen hat Will die Zeit bis zum Beginn der Verflüssigung dadurch abgekürzt, dass er eine innige Mischung der zu verimpfenden Saccharomycesarten mit der durch schwaches Erwärmen flüssig gemachten Bierwürzegelatine bewerkstelligte. So sah er in 7—55 Tagen die Proteolyse beginnen und zwar war diese Zeitdauer ebenfalls proportional dem Sauerstoffbedürfniss.

Die Vermehrung war an den oberflächlich gelegenen Schichten am stärksten, die Breite dieser Schichten variirte je nach dem Sauerstoffbedürfniss der Hefearten.

Die Verflüssigung begann unmittelbar unterhalb der Zone des stärksten Wachsthums, nach abwärts fortschreitend. Die Verflüssigungszone zeigte ausschliesslich oder am stärksten die Gährungserscheinungen, am geringsten eine Vermehrung, so dass, wenn die oberste Schichte fest blieb, in der unteren schneller

verflüssigten in der Regel nur ein sehr geringer Hefeabsatz erkennbar war.

Die oberste, dicht mit Hefezellen durchsetzte Wachsthumszone wurde von unten her sehr langsam verflüssigt, ebenso langsam von aussen nach innen, wenn sie untersank.

Bei Zerklüftung der Gelatine durch Gährungserscheinungen waren entweder die Zonen um die Tiefe der Spalten nach abwärts verschoben, oder es trat eine Verflüssigung überhaupt nicht ein.

Auf Grund dieser Ergebnisse kam Will zu dem Schlusse, dass die Luft direct oder indirect bei der Proteolyse durch die Hefen eine Rolle spielt und zwar dadurch, dass ihre Gegenwart der Bildung eines proteolytischen Enzymes hinderlich ist oder gebildetes wieder zerstört. Er sagt ferner: Soviel sich bis jetzt übersehen lässt, scheint die Verflüssigung der Gelatine eine Function nicht langsam absterbender und sich auflösender, sondern normaler Zellen zu sein, hervorgerufen durch Mangel an Nahrung und zwar nicht nur Mangel an gelöster Substanz überhaupt, speciell stickstoffhaltiger, sondern auch an Sauerstoff.

Die hienach vorhandenen Möglichkeiten, dass die Gegenwart von Sauerstoff erstens das proteolytische Enzym zerstört, zweitens der Bildung eines solchen hinderlich wäre, oder drittens dessen Ausscheidung hintanhält (resp. umgekehrt, dass Mangel an Sauerstoff die Ausscheidung auslöst), sollen im Folgenden erörtert werden. Eine weitere Annahme, die Beyerinck's, dass das Enzym nur aus Hefezellen stammt, welche aus Mangel an Sauerstoff zu Grunde gegangen sind, überhaupt ein Zusammenhang zwischen todten Zellen und der Proteolyse, wird von Will bestritten. Er hält die abgestorbenen Zellen nur für eine ständige Begleiterscheinung.

Dass die erste Erklärung nicht zutreffend ist, ja Sauerstoff auf die Proteolyse selbst eher begünstigend einwirkt, zeigt die Tabelle XVII.

Um die zweite Möglichkeit festzustellen, wurden in 80 Kolleschen Schaalen auf Bierwürzeagar Oberflächenculturen angelegt mit Stamm 24, einer Reincultur untergähriger Bierhefe aus der

wissenschaftlichen Station für Brauerei in München; die zum Impfen verwendete Cultur war ebenfalls schon vorher auf zwei Kolle'schen Schaalen herangezüchtet worden. Nach 48 Stunden wurden die ziemlich reichlich gewachsenen Culturen mittels eines Platinspatels abgehoben und 55 g einer teigartigen, gelblichweissen, sauer reagirenden Masse gewonnen, welche, sogleich mit 65 g Quarzsand und 10 g Kieselguhr verrieben, beim Auspressen 22 ccm eines deutlich sauer reagirenden, klaren, gelbbraunen Saftes ergab. Der Eiweissgehalt betrug nur 2,47 % (wohl in Folge der sauren Reaction); es wurden 5 ccm bei 37° im Thermostaten aufgestellt, eine Probe über Thymolgelatine geschichtet und eine Probe mit Carminfibrin versetzt. Nach 24 Stunden war im Presssaft überhaupt kein Coagulat mehr zu erhalten, das Carminfibrin war gelöst, ebenso von der Gelatine nach 24 Stunden das gleiche Volumen, nach 48 Stunden das dreifache Volumen des Presssaftes in Lösung gegangen. Diese, doch sicher im Vollgenuss des Sauerstoffes und ohne Mangel an diffusibler Nahrung gezüchtete und möglichst jung und kräftig eingeerntete Hefe enthielt also reichliches und kräftig wirkendes Verdauungsenzym oder, was nach weiter unten folgenden Darlegungen das Wahrscheinlichere ist, dessen Zymogen. Sie lieferte zugleich den Beweis, dass es in einer der beiden Formen auch in dieser Periode unter den günstigsten Umständen und ohne äusseren Anlass in den Hefezellen enthalten ist.

Ausserdem können, wie früher erwähnt, aus frischer Hefe vom jedem Wachsthumsstadium Leucin und andere Spaltungsproducte des Eiweisses erhalten werden, so dass schon Schützenberger auf »eine continuirlich wirkende Ursache« dieser Spaltung hinweisen konnte, »welche bei der Selbstverdauung der Hefe unter günstigeren Bedingungen nur gesteigert ist«. Auch sind die Eiweissderivate in frischen Hefezellen im gleichen Verhältniss auf Basen und Amidosäuren vertheilt wie in dem der völligen Verdauung unterworfenen Presssafte[1]). Proteolytisches Enzym oder vielmehr dessen Zymogen ist also unter allen Bedingungen in den Hefezellen vorhanden und in continuirlicher,

1) Siehe Tabelle No. VI.

wie wir annehmen dürfen, sehr gemässigter Wirkung, so dass ein Einfluss des Sauerstoffmangels auf die Bildung des Enzymes höchstens insofern anzunehmen ist, als unter den dadurch bedingten pathologischen Vorgängen intracellulär Enzym in grösserer Menge aus einem Zymogen (s. unten) gebildet wird, ohne aber extracellulär zunächst in Wirkung kommen zu können.

Was schliesslich die dritte Möglichkeit, die Verhinderung resp. Begünstigung einer Ausscheidung desselben betrifft, so sprechen vor Allem die Erfahrungen dafür, dass die lebenden Hefezellen auch bei Mangel an diffusibler Nahrung, wodurch doch gewöhnlich die Secretion ausgelöst werden kann, gar kein proteolytisches Enzym secerniren: Die Zellen können nur solche Eiweisskörper verwenden, welche in das Innere der Zellen gelangen; ausserhalb derselben in der Lösung vorhandene colloidale Eiweisskörper sind für das Enzym der normalen Hefezellen unerreichbar.

Auch hiezu existiren schon Beobachtungen von Thénard und Pasteur, dahingehend, dass Hefe bei Zusatz von Eiereiweiss als einzige Stickstoffquelle Zuckerlösung nicht zu vergähren vermag, also auch Vermehrung und Entwickelung der Hefezellen nicht stattfindet. Mayer's[1]) eingehende Versuche bewiesen ebenfalls, dass die verschiedenartigsten Proteïnstoffe fast nur in derselben Proportion zur Hefeernährung sich eignen, als sie durch Pergamentpapier diffundiren, und dass z. B. mit Albumin oder Caseïn ganz negative Resultate erhalten wurden. Es wäre ein sonderbarer und ohne Beispiel dastehender Fall, dass ein Pflanzenorganismus bei Gegenwart von colloidalen Eiweissstoffen als einzige Stickstoffquelle kein Verdauungsenzym auszuscheiden vermag, durch einfachen Sauerstoffentzug aber, auch bei Gegenwart von diffusibler Stickstoffnahrung dazu veranlasst würde. Will muss desshalb auch in gezwungener Weise als Zweck der Verflüssigung annehmen[2]), dass das Nährsubstrat der Diffusion des Sauerstoffes zugänglich gemacht werden soll.

1) Gährungschemie S. 129.
2) a. a. O. S. 182.

Es ist ferner nach mehreren zu diesem Zwecke angestellten Versuchen beim wiederholten Waschen und Auslaugen lebender Hefezellen mit destillirtem Wasser ein proteolytisches Enzym nie zu erhalten, während der Auszug energisch invertirende Wirkung besitzt; dabei sind die unteren Zellen bei 12stündigem Stehen bis zum Absetzen sicher ohne Sauerstoff, da, wie unten besprochen werden soll, Wasser durch lebende Hefezellen leicht völlig sauerstofffrei wird. Der im vorigen Abschnitt erwähnte Versuch einer Dialyse von invertirender und verdauender Enzymlösung stimmt mit diesen Beobachtungen überein. Invertin wird auch im Waschwasser gesunder Hefe gefunden, ist von dieser secernirt als verhältnissmässig leicht diffusible Substanz; das proteolytische Enzym ist nicht dialysirbar, kann also von normalen oder nur hungernden Zellen nicht secernirt werden.

Die Hefezellen stehen übrigens nicht vereinzelt da mit ihrer Eigenschaft, das reichlich in ihnen in irgend einer Form enthaltene, also wohl für eine intracelluläre Wirkung bestimmte proteolytische Enzym nicht secerniren zu können. Denn es ist Herrn Dr. Hahn und mir gelungen, auch in solchen Bacterienarten ein proteolytisches Enzym zu constatiren, bei welchen durch ihr Verhalten in der Cultur die Gegenwart desselben bisher nicht nachgewiesen werden konnte. In den zu anderen Zwecken nach der für die Hefe benützten Methode hergestellten Presssäften aus Massenculturen von Tuberkel- und Typhusbacillen war das Stattfinden einer Proteolyse unverkennbar. Die betreffenden Resultate mögen hier noch angefügt sein:

Tabelle XIX.

Coagulat in Procenten des Presssaftes aus Tuberkelbacillen			
frisch	nach Digestion bei 37°		
	nach 2 Wochen	nach 4 Wochen	nach 7 Wochen
I 0,86	0,39	—	—
II 0,54	—	0,43	—
III 0,95	—	—	0,75

Bei Versuch III wurde auch der Stickstoff des Filtrates nach dem Coaguliren bestimmt und vor der Digestion 0,297 % Stickstoff, nach derselben 0,455 % gefunden. Die grössere Ab-

nahme des Coagulates im Versuch I erklärt sich wohl dadurch, dass hier der Presssaft nur durch Papier, nicht durch Kieselguhrkerze filtrirt war, während in Versuch II und III die Kieselguhrfiltration die Menge des Enzyms oder derjenigen Stoffe, welche der Enzymwirkung zugänglich sind, verminderte.

Das Plasmin aus Typhusbacillen enthielt an coagulirbarer Substanz vor der Digestion 0,26%, nach achtwöchentlicher Digestion bei 37° 0,14%, liess also ebenfalls eine Abnahme erkennen. Selbstverständlich fand die Digestion unter Chloroformzusatz statt.

Ist nach diesen Ausführungen eine nachtheilige Beeinflussung der Ausscheidung des Enzymes oder eine Zerstörung des gebildeten Enzymes durch Sauerstoff nicht möglich, so bleibt für die Erklärung der Versuchsergebnisse Will's nur die Ansicht Beyerinck's übrig, welcher diese Erscheinungen als einen necrobiotischen Vorgang, als eine Folge des Absterbens der Hefe aufgefasst haben will. Er glaubt auch, dass das Absterben auf ganz bestimmte Weise stattfinden müsse.

Soll die Frage in dem Sinne entschieden werden, dass das Enzym aus abgestorbenen Zellen stammt, so ist vor Allem zu erörtern, ob die Versuchsanordnung Will's das Absterben der Hefe, und zwar kräftiger Hefe, gerade am Orte der Enzymwirkung zu bewerkstelligen vermag. Eine Wirkung des Sauerstoffabschlusses ist ja bei den Versuchen unverkennbar, am deutlichsten dort, wo der vorhandene Vorrath von Sauerstoff am schnellsten aufgebraucht ward. Es ist nun eine alte Erfahrung, dass Hefe ausserordentlich begierig Sauerstoff absorbirt; konnte doch Schützenberger[1]) auf Grund seiner Versuche die gelegentliche Bemerkung machen, dass völlig sauerstofffreies Wasser am besten zu erhalten ist durch Verrühren von 1 l Wasser mit wenigen Grammen frischer teigartiger Hefe und Stehenlassen der Mischung während ein paar Stunden. Ebenso gelang es ihm, Oxyhämoglobin seines Sauerstoffs schon dadurch zu berauben und arterielles Blut in venöses umzuwandeln, dass er dieses in einem Capillarnetz (also durch eine Membran isolirt)

1) a. a. O. S. 96.

durch Hefebrei bei Körpertemperatur leitete. Bei rascher Entwickelung und Zellvermehrung muss die Sauerstoffabsorption und der Process der inneren Verbrennung, der Respiration, mit besonderer Lebhaftigkeit in Erscheinung treten. Diese Annahme wird bestätigt durch die Erfahrung, dass umgekehrt reichliche Luftzufuhr die Vermehrung günstig beeinflusst. Bei Abschluss von Sauerstoff kann sich Hefe, allerdings etwas weniger stark, vermehren und normal entwickeln, wenn ihr die dann unerlässliche vergährungsfähige Substanz zu Gebote steht, und die nun eintretenden Spaltungsvorgänge als Ersatz für die respiratorische Thätigkeit gelten. Auch Pfeffer[1]) zählt die Hefepilze zu denjenigen Organismen, welche nur mit Hilfe der Gährthätigkeit für die Anaërobiose befähigt sind. Fehlen also beide der wichtigen Lebensbedingungen, Sauerstoff und Zucker, welche sich gegenseitig vertreten und allein für sich den ihnen angepassten, facultativ anaëroben Hefepilzen als Quelle der Lebensenergie dienen können, dann muss die Hefe durch Ersticken zu Grunde gehen.

Dieser Fall trat in Will's Versuchen ein und das dann frei werdende proteolytische Enzym bewerkstelligte die Verflüssigung der Gelatine. Versuche H. Buchner's und R. Rapp's[2]) zeigen nämlich, wie Zucker in Gelatine sehr leicht und ausgiebig zu diffundiren vermag, so dass Hefe, welche durch zwei dünne zuckerfreie Gelatineschichten von der zuckerhaltigen getrennt war, deren Zucker mit der gleichen Intensität vergohr, wie in einer direct auf der Zuckergelatine gezüchteten Controlcultur. Will lässt einen eventuellen Mangel an Zucker ausser Acht. Es fehlte aber sicher den Hefezellen derjenigen Zone, in welcher die Verflüssigung begann, an Sauerstoff und Zucker. Zum Theil war beides von den Zellen dieser Zone verbraucht, die nach Will gleich Anfangs bei verhältnissmässig geringer Vermehrung auch am stärksten Gährungserscheinungen zeigte, zum grossen Theil aber von den lebhaft wachsenden, sich vermehrenden und in voller Gährthätigkeit befindlichen Zellen der

1) Pflanzenphysiologie, II. Aufl. Bd. 1 S. 538.
2) Zeitschr. f. Biol.

obersten Zone auch den nächst unteren entzogen, ohne dass aus grösserer Tiefe wohl genügend nachdiffundirte. Eine solche Wirkung ist nur dann möglich, wenn die Zellen der obersten Zone sich bedeutend vermehrt haben und die jungen, kräftigen, viel zahlreicheren Zellen Zucker und Sauerstoff ihrer Zone und der benachbarten unteren benöthigen. Ebenso absorbiren sie den Sauerstoff der Luft und schneiden die unteren Schichten davon ab. Will's folgende Beobachtung stimmt völlig zu dieser Deutung: »Bei Beginn der Verflüssigung wird die Unterseite der Zone des stärksten Wachsthums, doch in geringer Breite sehr weich; hier finden sich reichlich todte Zellen, die in der Regel noch dicht mit Plasma erfüllt sind, also keinesfalls durch ein Hunger- und Auflösungsstadium hindurchgegangen sind. Es handelt sich jedenfalls um rasch in ihrer Vollkraft abgestorbene Zellen.« Will nimmt selbst an, dass sie in Folge von Kohlensäureansammlung oder Luftmangel zu Grunde gegangen seien, ohne dabei des Zuckers zu gedenken, der einen solchen Vorgang für gewöhnlich (in den untersten Schichten auch hier) hintanhält.

Bei der eben erörterten Annahme ist es leicht erklärlich, dass die Verflüssigung in der unmittelbar unter der oberflächlichen Zone gelegenen Region beginnen musste, da diese am ehesten ausgesogen ist, während die wenigen Zellen am unteren Ende des Reagensrohres länger an dem Vorrath von Zucker (weniger wohl Sauerstoff) zehren. Beim Fortschreiten der Verflüssigung nach unten werden sie neben den unteren Zellen der obersten Schicht den Theil der verhältnissmässig zahlreichen lebenden Zellen repräsentiren, welchen Will als für seine Hypothese bedeutungsvoll hervorhebt.

Ebenso notirt er als bemerkenswerth, dass der Hefenabsatz bei sehr rascher Verflüssigung meist nur ein geringer ist. Das ist dadurch erklärlich, dass bei rascher Verflüssigung durch den Inhalt der in der zweitobersten Zone, vielleicht in etwas grösserer Anzahl und in besonders kräftigem Zustande erstickten Zellen die unteren Schichten verflüssigt wurden, bevor sich die dort vorhandenen Zellen soweit vermehrt hatten, als dies bei langsamer Verflüssigung unzweifelhaft geschieht.

Es ist jedenfalls von Bedeutung, ob die Zellen erschöpft oder voll und kräftig, alt oder jung sind. Auch dafür gibt Will selbst ein Beispiel (S. 169): In einem Falle mit Oberhefe Rio waren die lebenden Zellen zu Beginn und später voller, von besserem Aussehen und reich an Glykogen. Die Verflüssigung trat rasch ein, am Schlusse war die grösste Anzahl der lebenden Zellen noch in vorzüglicher Beschaffenheit, aber — gemengt mit 40% todten Zellen. Man muss hier annehmen, dass gerade die kräftigen Zellen mehr Energiequellen nöthig und oberflächlich mehr verbraucht hatten, in der Verflüssigungszone schneller erstickt waren und in grösserer Menge Enzym geliefert und dadurch die Verflüssigung schneller zu Ende geführt hatten. Manche Beobachtungen Will's und die Erfahrung, dass Zellen, welche an Oberflächenculturen langsam in Folge von Hunger oder Altersschwäche abgestorben sind, keine oder nur eine ganz schwache Verflüssigung der Gelatine zu bewerkstelligen vermögen, sprechen dafür, dass das Enzym bei der längeren intracellulären Wirkung fast völlig aufgebraucht wird und in schwachen Zellen überhaupt in geringerer Menge enthalten ist. Das sei aus folgendem Grunde erwähnt: Wenn Will anführt, dass bei einem necrobiotischen Vorgang sich ein umgekehrtes Bild zeigen müsste, als das von ihm geschilderte, so wäre dies höchstens richtig, wenn das Enzym nur aus langsam absterbenden Zellen stammen würde, nicht aber grösstentheils aus kräftigen, rasch erstickten Zellen, wie aus seinen Versuchen hervorgeht. Aus dem gleichen Grunde muss auch die Ansicht Beyerinck's für einen necrobiotischen Vorgang als Ursache der hier stattfindenden, verhältnissmässig kräftigen Proteolyse unter dieser Einschränkung angenommen werden.

Dass die wenigen Zellen zunächst der einen Zone soviel Enzym liefern können, um die immerhin beträchtliche Proteolyse zu Stande zu bringen, ist nach den vorliegenden Versuchen nicht zweifelhaft. Die lange, Wochen bis Monate währende Dauer der Verflüssigung spricht weiter dafür, dass das zuerst und zu dieser Zeit auch stark wirkende Enzym völlig aufgebraucht und durch dasjenige neu absterbender (alter) Zellen spärlich ersetzt wird. Will bemerkt wiederum selbst, dass der Procentsatz der todten Zellen im ersten Stadium ein grösserer ist als im späteren; durchschnittlich enthält die flüssige Gelatine 10%, der Bodensatz 15% todte Zellen. Wurden Culturen,

wie solche Will ansetzte, nach kurzer Zeit ganz unter Sauerstoffabschluss aufgestellt, so war die Vermehrung auch in den oberen Schichten gehemmt, und es trat die Verflüssigung nicht ein oder »war nicht bestimmt mit der Versuchsanordnung in Einklang zu bringen«. Desto leichter ist dieses Ergebniss aber in Einklang zu bringen mit der oben geäusserten Ansicht, dass die wenigen Zellen länger mit dem Vorrath an Zucker auskamen, besonders da facultativ Anaërobe sehr oft ökonomischer bei Mangel als bei Zutritt von Sauerstoff arbeiten[1]); bei den anderen Versuchen tritt dies in den untersten Regionen stets ein.

Analog diesen Ausführungen sind wohl folgende Beobachtungen zu erklären: je rascher die Verflüssigung, in desto besserer Verfassung befinden sich die Zellen (N. β. wohl der unteren Zone); je langsamer die Verflüssigung, desto mehr Zellen zeigen Hungerzustand und desto mehr todte Zellen sind vorhanden. In der verflüssigten Zone fehlen Mittelglieder zwischen todten und den übrigen Zellen, die sich in stärkerem Hungerzustande oder in mehr oder minder vorgeschrittener Auflösung befänden; letzteres ist wohl deshalb der Fall, weil durch die Verflüssigung der untersten Schichten deren Zucker der Verwendung zugänglich wird und dadurch die Zellen der untersten und obersten Schichten, welche noch nicht abgestorben waren, weiter existenzfähig bleiben[2]); nach dem Untersinken der obersten Schichte mit ihrem, den Sauerstoff abschliessenden Hefezellencordon hat auch der Sauerstoff wieder Zutritt durch die ganze Flüssigkeit und kann seinerseits wieder den Zucker vertreten und die nach der Verflüssigung oft lebhaftere Vermehrung ermöglichen (S. 183); die übrige Nahrung ist wohl fortgesetzt in hinreichender Menge vorhanden. Daher die auffallend lange Zeitdauer, innerhalb welcher von dem schon erschöpften und nun spärlich erneuerten Enzym der letzte Rest der Gelatine verflüssigt wird, welcher überdies gestützt ist von den ihn wie ein Gerüst durchsetzenden, sehr zahlreichen Sprossverbänden. Damit stimmt auch die folgende Beobachtung Will's überein: »Je früher die obere unverflüssigte Zone zu Boden sinkt, desto rascher wird auch dieser Theil verflüssigt und umgekehrt«, nicht aber mit der Folgerung Will's auf einen entsprechend besseren Zustand der die Proteolyse bewirkenden Zellen, welche Erklärung in diesem Stadium und in dieser Zone ja auch einer günstigen Beeinflussung durch Sauerstoffmangel widersprechen würde.

Nicht zu vernachlässigen ist jedenfalls in gewissen Stadien und Schichten ein das Enzym schädigender Gehalt an Alkohol. Es mag z. B. das Enzym derjenigen Zellen, welche nach Will in den untersten Schichten an der Peripherie der dort oft wohlausgebildeten Colonien in grösserer Anzahl absterben, als dort angehäuftes Abfallproduct besonders schädigen und vielleicht sogar das Absterben dieser Zellen bedingen oder beschleunigen und intracellulär das Zymogen zerstören, analog einer unten zu besprechenden Beobachtung Beyerinck's.

---

1) Pfeffer, Pflanzenphysiologie II. Aufl., Bd. 1, S. 538.

1) Diese Möglichkeit auch von Will hervorgehoben, S. 181.

So besteht in der That die Möglichkeit, sämmtliche Resultate aus Will's Versuchen in ungezwungener Weise auch mit Beyerinck's Ansicht, welcher ich zum grössten Theil beipflichte, in Einklang zu bringen: Das nur für intercelluläre Wirkung bestimmte proteolytische Enzym wird durch normale Zellen nicht secernirt, sondern dessen Freiwerden ist nur möglich nach vorhergehendem Absterben der Zellen und dieses wird in unserem Falle in dem für die proteolytischen Erscheinungen nöthigen Grade nicht durch Verhungern derselben, sondern durch Ersticken in Folge eines Versiegens der Energiequellen, des Sauerstoffs und Zuckervorrathes, bedingt.

Unter der ersten pathologischen Bedingung im Hungerzustande tritt zunächst ein Abbau der Eiweissstoffe ein, dessen Ursache nicht in intramolecularer Athmung, sondern sicher ebenfalls in der Wirkung des proteolytischen Enzymes zu suchen ist, da die Zersetzungsproducte den durch Einwirkung des Enzymes entstehenden qualitativ und quantitativ entsprechen.[1]) Eine solche Selbstverdauung, in der Erscheinung vergleichbar dem Abmagern des hungernden thierischen Organismus und in den Hefezellen ebenfalls mikroskopisch controlirbar durch das Grösserwerden der Vacuolen auf Kosten des Plasmas, kann ziemlich weit fortschreiten, ohne das Leben der Hefezellen aufzuheben. Die so geschwächten Zellen erholen sich dann, unter günstige Bedingungen gebracht, bald bis zur völligen Activität. Der ganze Vorgang ist chemisch nur nachweisbar durch die nach aussen getretenen Verdauungsproducte und Abnahme des Eiweissgehaltes der Zellen.

Jeder äussere Factor, welcher eine Schädigung der Lebensenergie der Hefezellen bedingt, hat auch eine intracelluläre Bildung resp. Vermehrung des proteolytischen Enzymes der Hefe zur Folge. Darin dürfte auch die Erklärung für Beyerinck's S. 35 citirten Versuch zu suchen sein, in welchem er daraus auf eine völlig tryptische Natur des Hefeenzymes schloss, dass Hefe auf alkalischer Gelatine (= 0,2% $Na_2 CO_3$) schneller eine Verflüssigung herbeiführte als auf sauerer (= 0,2 H Cl%). Die Alkalinität

1) s. Tabelle VI.

wirkte zwar schädigend auf die Wirkung des Enzymes, das nach den vorliegenden Untersuchungen durch alkalische Reaction gehemmt, wenn auch nicht vernichtet wird, aber begünstigend auf die Bildung des Enzymes und zwar dadurch, dass die Entwickelung der Hefezellen auf alkalischer Gelatine, wie man annehmen darf, bedeutend gehemmt ist, und mehr Zellen und diese in kürzerer Zeit zu Grunde gehen; die alkalische Reaction in dem angegebenen Grade wird überdies bald durch den Hefestoffwechsel, besonders wenn die Proteolyse beginnt, in eine saure, für die Wirkung nunmehr günstige umgewandelt sein. Auf mässig saurer Gelatine gedeiht Hefe sehr gut und bewirkte in Folge dessen ebensowenig eine Verflüssigung wie normale Oberflächenculturen der meisten Hefearten; allenfalls aus abgestorbenen alten Zellen stammendes spärliches Enzym kann begreiflicher Weise durch die Acidität, die in Folge des Hefewachsthums über das vorhandene eben noch zulässige Maass gesteigert ist, bedeutend gehemmt werden.

Ein ganz ähnlicher pathologischer Zustand mit den gleichen Folgen, wie sie die Will'sche Versuchsanordnung bedingt, lässt sich herbeiführen, wenn wir in einem geräumigen Stöpselglase zu teigartiger Hefe einige Tropfen Chloroform geben und nach dem Verschlusse im Glase verdunsten lassen. Die Masse geräth bald in Folge intracellulärer Vergährung des Glykogens durch Zymase in lebhaftes Schäumen, wird nach wenigen Stunden syrupartig, dann dünnflüssig und stellt nach mehrtägigem Stehen bei 37° eine dunkelbraune Flüssigkeit mit voluminösem, weissem, fast stickstofffreiem Bodensatz dar, welcher in einem Falle 21 % der Hefetrockensubstanz betrug und nur noch aus Cellulose bestehen dürfte. Man kann annehmen, dass mit dem Beginn der Gährung, welche bei 27° ca. einen Tag dauerte, die betreffenden Zellen durch Chloroformwirkung abgestorben sind und zu gleicher Zeit auch die Verdauung einsetzt.

Das Zerreiben der Hefezellen mit Quarzsand wäre nach Beyerinck als jenen Todesarten gleichwerthig zu erachten. Er bemerkt nämlich in seiner wiederholt citirten Abhandlung, dass das Absterben der Hefe auf eine bestimmte Weise stattfinden

müsse (siehe S. 47), wenn die Proteolyse deutlich in Erscheinung treten solle. In negativem Sinne trifft dies zu bei sehr langsam, z. B. aus Altersschwäche absterbenden Zellen, die, wie schon erwähnt, sehr geringe oder keine Verflüssigung mehr hervorrufen.

Zur Stütze obiger Ansicht bemerkt Beyerinck, dass in frischer Hefe, welche durch Einwerfen in Alkohol plötzlich getödtet wurde, das Verdauungsenzym ebenso sicher verloren sei als bei den gleichen Versuchen mit Pankreasdrüse. Abgesehen davon, dass z. B. nach Kühne[1]) Alkohol eine Spaltung des Trypsinogens und Auftreten des Trypsins verursacht, so konnten auch diese Resultate bei einer Nachprüfung des Versuches nicht bestätigt werden. Frische Hefe wurde mit dem doppelten Gewichte absoluten Alkohols verrührt, die Mischung blieb eine Stunde stehen, dann wurde die Hefe durch starkes Abpressen und Trocknen bei 37° von dem Alkohol befreit. Als sie darauf mit der fünffachen Menge Chloroformwassers bei 37° aufgestellt wurde, war eine Verdauung allerdings erst einige Tage später als sonst durch Bräunung der Flüssigkeit bemerkbar, trat aber dann (auch nach der Stickstoffbestimmung zu schliessen) fast im selben Grade wie sonst ein. Ein Theil, als Controlprobe aufgekocht, blieb unverdaut. Durch Verreiben der mit Alkohol getödteten und getrockneten Hefe gelang es allerdings nicht, unter Wasserzusatz einen wirksamen Presssaft zu erhalten. Da, wie aus den Versuchen auf Seite 39 zur Reindarstellung des Enzymes ersichtlich, das Enzym dem Alkoholniederschlage durch Wasser wieder entzogen werden kann, so deutet das Ergebniss dieses Versuches darauf hin, dass hier der Alkoholniederschlag nicht Enzym, sondern das complicirter zusammengesetzte Zymogen enthielt. Die Auspressmethode wäre dann unzureichend für eine Extraction des durch Alkohol denaturirten Zymogens gewesen. Bei dem Chloroformwasser-Versuche müsste man annehmen, dass das Zymogen allmählich unter reichlichem Wasserzutritt und begünstigt durch die saure Reaction in Enzym übergeht.

1) cit. Gamgee, Chemie der Verdauung 1897, S. 231.

Aus Salkowski's Versuchen geht überdiess hervor, dass bei frischer Hefe, welche in Chloroformwasser vertheilt wurde und so jedenfalls fast in gleicher Zeit[1]) wie durch Alkohol abgetödtet war, die Selbstverdauung stark in Erscheinung trat.

So würde sich auch das Fehlen des Enzymes in Beyerinck's Versuch erklären lassen durch die Annahme einer denaturirenden Einwirkung des Alkohols auf ein Zymogen.

Es ist jedoch vollkommen zutreffend, wenn er die Todesart der Hefe als wichtig für die Stärke der beobachteten Verdauung hervorhebt. Der Tod durch Ersticken, sei es in Folge Sauerstoff- und zugleich Zuckermangels oder in der Chloroformatmosphäre, scheint diejenigen pathologischen Zustände in den eiweissreichen, noch kräftigen Zellen zu bedingen, welche die ausgiebigste Bildung von Enzym zur Folge haben.

Nach manchen Analogien mit anderen, in saurer Lösung wirksamen pflanzlichen und thierischen Verdauungsenzymen darf man folgern, dass bei allen diesen krankhaften Erscheinungen die Bildung des proteolytischen Enzymes dadurch eingeleitet wird, dass zunächst organische und unorganische Säuren oder saure Salze die Reaction des Hefeplasmas beeinflussen und weiterhin eine Umwandlung des Zymogens in Enzym verursachen. Ein Versuch, der diese Annahme beweisen sollte, gab insofern nicht das erwartete Resultat, als ein unter Zusatz von Magnesiumoxyd zum Quarzsand und Kieselguhr hergestellter, alkalisch reagirender Presssaft deutliche, wenn auch natürlich gehemmte proteolytische Wirkung zeigte, wobei andrerseits die Möglichkeit besteht, dass beim Zerreissen der Zellen der saure Zellsaft zunächst mit dem Plasma in Berührung kam, bevor er durch das Magnesiumoxyd neutralisirt wurde.

Das beim Herstellen des Hefepresssaftes nöthige Zerreiben bedingt eine Mischung des sauren Zellsaftes mit dem alkalischen Plasma und in Folge dessen die Abspaltung und die besonders

1) Ein Controlversuch zeigte, dass Hefe, in Chloroformwasser geschüttelt, noch lebensfähig war, als sie nach einer Minute auf Bierwürze übergeimpft wurde, abgetödtet aber, als dies nach drei Minuten geschah, während mit Alkohol und Hefe nach einer Minute schon die Bierwürze steril blieb.

starke Anhäufung des proteolytischen Enzymes in dem beschriebenen Produkte.

Schlussfolgerungen.

1. Der aus Hefezellen nach Zertrümmerung derselben mittels geeigneter Reibmethode durch hohen Druck ausgepresste Zellinhalt schliesst auch ein kräftig wirkendes, proteolytisches Enzym ein, welches nicht nur das reichlich vorhandene Eiweiss des Presssaftes selbst, sondern auch andere Eiweissstoffe zu hydratisiren vermag.

2. Die stickstoffhaltigen Substanzen werden dabei in der Weise zerlegt, dass am Schlusse von dem Stickstoff der Verdauungsprodukte ungefähr 30% auf die Basen und 70% auf die Amidosäuren vertheilt sind, im gleichen Verhältniss, wie diese Körper auch in dem vom Eiweiss befreiten frischen Presssafte gefunden werden.

3. Die Xanthinkörper, welche in geringer Menge (50 bis 100 mg pro 100 ccm Presssaft) auftreten, zeigen insofern ein interessantes Verhalten, als sie unter normalen Umständen nach der Verdauung noch in latenter Form vorhanden sind und nur durch Kochen mit einigen Säuren manifest werden. Bei Gasdurchleitung (ausser Kohlensäure) zu Anfang der Verdauung und beim Evacuiren des Saftes während der ganzen Dauer der Proteolyse werden die Xanthinkörper direct fällbar. Die Wirkung dieser Manipulationen muss zurückgeführt werden auf Entfernung der in Folge der Hydratationsvorgänge auftretenden Kohlensäure. Doch bleibt die Möglichkeit bestehen, dass ausser der Kohlensäure noch andere chemische Substanzen oder physikalische Bedingungen eine Latenz der Xanthinkörper zur Folge haben können.

4. Der grossentheils organisch gebundene Phosphor wird bei der Digestion zu $^4/_5$ bis $^5/_6$ in Phosphorsäure übergeführt und zwar kann der grösste Theil schon nach einstündiger Digestion bei 37° in dieser Form nachgewiesen werden.

5. Die Menge der Schwefelsäure, deren Schwefel in frischem Presssaft $^1/_4$ des Gesammtschwefels beträgt, steigt nur unwesentlich an.

6. Albumosen treten während des ganzen Spaltungsprocesses nur vorübergehend in geringer Menge auf; echtes Pepton ist auch intermediär nicht nachzuweisen: ebensowenig ist Pepton unter normalen Umständen in der Hefe zu finden.

7. Das Optimum der Temperatur für die Wirksamkeit des Enzymes befindet sich zwischen 40° und 45° C.

Die Tödtungstemperatur wird durch 60° erreicht.

Die Dauer der Wirksamkeit beträgt bei 37° nur 9 bis 15 Tage.

8. Zufuhr von Sauerstoff wirkt eher fördernd als nachtheilig auf die Proteolyse ein.

Antiseptica wirken bei Zusatz der gewöhnlich gebrauchten Mengen nicht hemmend, ausgenommen Sublimat und Phenol,

Blausäure hebt die Wirkung des Enzymes nicht auf, übt aber, in grösserer Menge zugesetzt, einen geringen nachtheiligen Einfluss aus.

Neutralsalze wirken, auch in concentrirterer Lösung, begünstigend,

Glycerin und Rohrzucker bei höherer Concentration hemmend.

Säuren begünstigen die Wirkung des Enzymes; das Optimum entspricht 0,2% Salzsäure.

Alkalien üben schon durch Neutralisation des schwach sauren Presssaftes einen stark nachtheiligen Einfluss aus.

Alkohol wirkt bei 5% schon nachtheilig, ebenso ist die Verdauung eines im Vacuum concentrirten Presssaftes gehemmt.

9. Das proteolytische Enzym der Hefe stellt einen neuen Typus der Verdauungsenzyme insofern dar, als es bezüglich der nöthigen Reaction den peptischen, in Bezug auf die Verdauungsproducte den tryptischen Enzymen entspricht, in seinem Verhalten gegen die Peptone aber mit keinem der bekannten Enzyme übereinstimmt.

10. Das Enzym lässt sich in verhältnissmässig reinem Zustande isoliren und dann nur mehr mit Alkohol, Bleiacetat, Mercurinitrat und Mercurichlorid fällen, ist coagulirbar, gibt

aber keine Millon'sche und keine Biuretreaction. Es ist nicht dialysirbar.

11. Das proteolytische Enzym ist, vermuthlich in Form eines Zymogens, unter allen Umständen in den Hefezellen enthalten; das Enzym kann aber von normalen Zellen zum Zwecke der Nutzbarmachung (Peptonisirung) extracellulärer colloidaler Eiweissstoffe nicht secernirt werden; es gelangt auf diese nur zur Wirkung, wenn es durch ein in bestimmter Weise erfolgtes Absterben der Hefe gebildet wird, und nach dem Tode derselben austreten kann. Auch bei Will's Versuchen muss diese Annahme aufrecht erhalten werden und steht in vollem Einklang mit dessen Versuchsergebnissen.

12. Im normalen Plasma scheint aus dem Zymogen continuirlich durch Säurezutritt proteolytisches Enzym gebildet zu werden. Dieses bewerkstelligt in minimaler Menge und in einer durch chemische und physikalische Eigenschaften des Plasmas sehr gemässigten Weise die intracellulären »Desassimilationsvorgänge«, den continuirlichen Abbau des Hefeplasmas, dessen Verhältniss zum Aufbau wiederum abhängig ist von der Menge der gebotenen Nahrungs- und Energiequellen und dem Alter der Zellen.

Für die Anregung zu vorstehenden Arbeiten, sowie für die freundlichst gewährten werthvollen Rathschläge spreche ich Herrn Privatdocent Dr. M. Hahn meinen ergebensten Dank aus, ebenso Herrn Professor Dr. H. Buchner für die gütige Erlaubniss, die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Vita.

Geboren bin ich, Ludwig Geret, evangelischer Confession, am 8. August 1872 zu Feldkirch in Vorarlberg als Sohn des verstorbenen Kaufmanns Gottlieb Geret.

Ich besuchte in Feldkirch 5 Classen der Volksschule, darauf 3 Classen des dortigen Staatsgymnasiums; nach dem Tode meines Vaters im Jahre 1886 zog meine Mutter nach Rothenburg a. T., Kreis Mittelfranken, wo meine Eltern beheimathet sind und dort absolvirte ich noch zwei Classen der Lateinschule, darauf die erste Classe des humanistischen Gymnasiums in Ansbach.

Nun entschloss ich mich, Apotheker zu werden und brachte die dreijährige Lehrzeit in Rothenburg a. T. bei Herrn Apotheker Zemsch zu. Nach bestandenem Gehilfenexamen conditionirte ich 1 Jahr in Stuttgart, anderthalb Jahre in Zürich und $^1/_2$ Jahr in Homburg vor der Höhe.

Im Herbste 1896 bezog ich die hiesige Universität und bestand das Staatsexamen nach dreisemestrigem Studium mit Note I. Nach kurzem Aufenthalt im Kgl. Botanischen Institut trat ich, zunächst als Hilfsassistent, im hygienischen Institut ein, wo ich bis jetzt verblieb.

Während meiner bisherigen Studienzeit hörte ich die Herren Docenten:

Prof. Dr Goebel, Geheimrath Prof. Dr. v. Baeyer, Prof. Dr. v. Lommel, Geh.-Rath Prof. Dr. v. Zittel, Hofrath Prof. Dr. Hilger, Prof. Dr. Solereder, Prof. Dr. Muthmann, Docent Dr. Giessenhagen, Prof. Hertwig, Prof. Dr. Thiele, Prof. Dr. Koenigs, Dozent Dr. Loew, Priv.-Dozent Dr. Willstätter, Prof. Dr. H. Buchner.

Praktisch arbeitete ich im chemischen, botanischen, pharmazeutischen, zoologischen und hygienischen Laboratorium.